



**Pedro Miguel da Cunha Produção de celulose bacteriana a partir de
Carreira resíduos industriais**



Pedro Miguel da Cunha **Produção de celulose bacteriana a partir de resíduos**
Carreira **industriais**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais Derivados de Recursos Renováveis, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Luisa Seuanes Serafim, e da Doutora Eliane Trovatti, do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

O júri

Presidente

Professora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier
Professora auxiliar da Universidade de Aveiro

Doutora Filomena Freitas
Investigadora Pós-Doutoramento do Requite, FCT-UNL

Professora Luísa Seuanes Serafim
Professora auxiliar convidada da Universidade de Aveiro

Doutora Eliane Trovatti
Investigadora Pós-Doutoramento da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Gostaria de agradecer especialmente às minhas orientadoras, Professora Doutora Luisa Seuanes Serafim e Doutora Eliane Trovatti pelo apoio, orientação e conhecimentos transmitidos ao longo de todo o trabalho.

Ao Professor Doutor Armando Silvestre e à Doutora Carmen Freire pelo acompanhamento e sugestões feitas ao longo do trabalho.

À Professora Doutora Ana Xavier pela cedência do licor ao sulfito e de equipamento e à sua aluna de doutoramento Susana Pereira pela ajuda prestada na utilização do equipamento.

À Joana Mendes, aluna de mestrado do Professor Doutor Dmitry Evtugin, pela cedência do licor de folhelho de uva.

Ao grupo de Engenharia Bioquímica e Processos do Departamento de Química da FCT/UNL, pela cedência do resíduo de produção de biodiesel e soro do leite.

À doutora Rosário Soares pela disponibilidade na caracterização do material por difracção de raio-X.

Aos colegas do grupo de investigação de Materiais Macromoleculares e Lenhocelulósicos, em especial aqueles com que partilhei o laboratório pelo bom ambiente, apoio e colaboração que tornaram a realização deste trabalho mais fácil.

A todos os meus amigos e principalmente à minha família pelo apoio que sempre me deram.

palavras-chave

Celulose Bacteriana, custo de produção, *Gluconacetobacter xylinus*, licor ao sulfito, licor de folhelho de uva, soro do leite, resíduo de produção de biodiesel

resumo

Com o previsível esgotamento dos recursos fósseis, os materiais derivados de recursos renováveis têm ganho importância, para que no futuro possam substituir os produtos de base petroquímica. Um dos materiais de origem renovável com maior potencial é a celulose bacteriana (CB), um polissacarídeo sintetizado por algumas bactérias com propriedades estruturais e mecânicas únicas que lhe proporcionam aplicação em várias áreas. No entanto, o elevado custo do meio de cultura limita a produção de CB a nível industrial, uma vez que o preço do produto final será elevado. Neste trabalho foi estudada a produção de CB a partir de resíduos ou subprodutos baratos da indústria portuguesa pela bactéria *Gluconacetobacter xylinus*, com o objectivo de diminuir os custos de produção. Escolheram-se resíduos da indústria da pasta e papel, vinho, lacticínios e do biodiesel e os resultados mostraram ser possível a produção de CB. Os melhores resultados foram obtidos com os resíduos da indústria do vinho e da pasta do papel, 0.63 e 0.43 g/L de CB, respectivamente, sem adição de qualquer outro nutriente, após 96 horas. O estudo dos resíduos para a produção de CB foi efectuado em paralelo com meio sintético contendo as fontes de carbono predominantes nos substratos escolhidos de forma a comparar resultados e avaliar a contribuição de outros componentes presentes. Verificou-se que a produção de CB foi elevada nos meios de glucose, glucose:galactose (1:1) e glicerol, e reduzida nos meios de xilose e lactose. Este estudo incluiu ainda testes em que se verificou a necessidade de adição de fonte de azoto e fósforo de forma a ultrapassar as limitações nutricionais dos resíduos. Amostras de CB produzida através dos diferentes resíduos foram caracterizadas por FTIR, XRD e SEM. Foram obtidos espectros típicos de celulose do tipo I, bem como confirmada a estrutura tridimensional da CB.

keywords

Bacterial Cellulose, production cost, *Gluconacetobacter xylinus*, sulphite spent liquor, grape skins liquor, cheese whey, biodiesel production by-product

abstract

With the predictable depletion of oil resources, materials derived from renewable resources are becoming very attractive in order to replace petrochemical-based materials in the future. Bacterial Cellulose (BC) is a renewable material with a high potential since it is a polysaccharide produced by some bacteria with unique structural and mechanical properties which provide application in many fields. However, the high cost of the culture medium limits the industrial production of BC. In this work, BC production by *Gluconacetobacter xylinus* using cheap raw materials from Portuguese industries was studied with the objective of decreasing production costs. By-products and residues from paper, wine, milk and biodiesel industries showed to be suitable for BC production. The best results were obtained with the wine and paper by-products, 0.63 and 0.43 g/L, respectively, without the addition of any other nutrient, after 96 hours. In parallel with the objective of comparing results and evaluate the contribution of the other components of the medium to the BC production, experiments in complex media with the main carbon sources of the by-products were performed. It was verified that there was a high BC production in glucose, glucose:galactose (1:1) and glycerol media, and a low one in the xilose and lactose media. This study also evaluated the need of media supplementation with nitrogen and phosphorus sources to overcome the nutritional limitations of the by-products. Samples of BC membranes produced from the different by-products were characterized by FTIR, XRD and SEM. All the spectra obtained confirmed the typical characteristics of cellulose type I, and the three-dimensional structure of BC was confirmed.

Índice

Índice	I
Abreviaturas	III
Índice de figuras	V
Índice de Tabelas	IX
1. Introdução	1
1.1. Celulose Vegetal	2
1.2. Celulose Bacteriana	5
1.2.1. Morfologia da CB	6
1.2.2. Aplicações	8
1.3. Biossíntese	9
1.3.1. Síntese da UDPGlc	10
1.3.2. Mecanismo de polimerização	12
1.4. Processos de produção em condição estática e agitada	13
1.5. Produção de CB a partir de resíduos industriais	15
2. Materiais e métodos	19
2.1. Microrganismo	19
2.2. Meio de Cultura	19
2.3 Ensaio efectuados e amostragem	19
2.3.1 Inóculo	19
2.3.2 Produção de CB em meios de cultura referência.....	19
2.3.3 Produção de CB a partir dos resíduos	20
2.4. Lavagem e purificação	20
2.5. Quantificação de fontes de carbono	20

2.6. Caracterização da CB	21
2.6.1. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	21
2.6.2. Difração de Raio-X.....	21
2.6.3. Microscopia electrónica de varrimento (SEM)	22
2.7. Cálculos	22
3. Resultados e Discussão	23
3.1. Produção de CB utilizando meios referência.....	23
3.2. Produção de CB a partir de resíduos.....	25
3.2.1. Quantificação das fontes de carbono principais	26
3.2.2. Testes de diluições dos resíduos	28
3.2.3. Produção de CB a partir dos resíduos com concentração optimizada.....	30
3.3. Comparação dos rendimentos e produtividades utilizando resíduos e os respectivos meios de referência complexos	32
3.4. Efeito da adição de nutrientes aos resíduos	35
3.5. Caracterização da CB	39
3.5.1. FTIR.....	39
3.5.2. Difracción de Raio-X.....	40
3.5.3. SEM.....	41
4. Conclusões	43
5. Referências bibliográficas.....	45

Abreviaturas

[]	Concentração
α	Grau de conversão de substrato
CS	Celulose Sintetase
CB	Celulose Bacteriana
CV	Celulose Vegetal
DP	Grau de polimerização (<i>degree of polymerization</i>)
E.L.	Extracto de levedura
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
Gal	Galactose
Glc-6-P	Glucose-6-fosfato
<i>G. xylinus</i>	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>
Glu	Glucose
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High-performance liquid chromatography</i>)
HS	Hestrin e Shramm
HSSL	Licor ao sulfito de madeira de folhosas (<i>Hardwood Sulphite spent liquor</i>)
LFU	Licor de folhelho de uva
LPS	Lipo-polissacarídica
OOA	Oxaloacetato
P	Fosfato
r_{CB}	Taxa de produção de Celulose Bacteriana (g/L.h)
RPB	Resíduo de produção de biodiesel
S	Substrato
S_i	Substrato inicial
S_0	Substrato final
SEM	Microscopia electrónica de varrimento (<i>scanning electron microscope</i>)
SSSL	Licor ao sulfito de madeira de resinosas (<i>Softwood Sulphite spent liquor</i>)
SL	Soro do leite
UDPGlc	Uridina difosfato-glucose
XRD	Difracção de raio-X (<i>X-ray diffraction</i>)
$Y_{CB/S}$	Rendimento de Celulose Bacteriana/Substrato (g/g)

Índice de figuras

Figura 1. Estrutura molecular da celulose [10].....	2
Figura 2. a) e b) representam as ligações intra e inter-moleculares na celulose [11].....	3
Figura 3. Organização da parede celular fibrosa. A – fibras de celulose; B – macrofibrilas; C – microfibrilas; D – fibrilas elementares; E – molécula de celulose; F – células unitárias de celulose cristalina; G – celobiose [12].	4
Figura 4. Projeções axiais das estruturas de celulose I e de celulose II.....	4
Figura 5. Organização microfibrilar de a) CB produzida por <i>G. xylinus</i> e b) pasta de madeira, ampliação 5000× [16].....	7
Figura 6. Membranas de CB em estado hidratado.	7
Figura 7. Porção de membrana de CB seca.	8
Figura 8. Nata de coco. [33]	9
Figura 9. Vias bioquímicas para a produção de celulose bacteriana por <i>G. xylinus</i> . 1- glucose permease; 2- glucocinase (ATP) (EC 2.7.1.2); 3-fosfoglucomutase (EC 5.3.1.9); 4- UDPGlc pirofosforilase (UTP) (EC 2.7.7.9); 5- celulose sintetase (EC 2.4.1.12); 6- fosfoglucoisomerase (EC 5.3.1.9); 7- glucose-6-fosfato desidrogenase (NADP) (EC 1.1.1.49); 8- transaldolase (EC 2.2.1.2); 9 - frutose difosfatase (EC 3.1.3.11); 10- aldolase (EC 4.1.2.13); 11- triose fosfato isomerase (5.3.1.1); 12- glicerol-3-fosfato desidrogenase (NAD) (EC 1.1.1.8); 12a- glicerol-3-fosfato desidrogenase (FAD); 13- glicerol desidroxiacetonquinase (ATP); 14- transcetolase (EC 2.2.1.1); 15- piruvato descarboxilase (EC 4.1.1.1); 16- oxaloacetato desidrogenase (EC 4.1.1.3); P- fosfato; OAA- oxaloacetato [11].	11
Figura 10. Montagem das microfibrilas de CB pela <i>G. xylinus</i> [16].....	13
Figura 11. Celulose bacteriana produzida em meio estático (A)) e em meio agitado (B)), com a glucose como fonte de carbono.....	14

Figura 12. Morfologia das colónias de <i>A. xylinum</i> E ₂₅ . As setas finas indicam colónias não produtoras de celulose (Cel ⁻), as setas grossas indicam colónias produtoras (Cel ⁺) [42].	15
Figura 13. Evolução da produção de CB nas experiências com glucose, xilose, glu+gal, lactose e glicerol em meio HS.	23
Figura 14. Variação do pH dos meios sintéticos ao longo de 96 horas de produção de CB.	25
Figura 15. Quantidades de CB obtidas nas experiências utilizando resíduos comparadas com as obtidas pelas referências.	27
Figura 16. Resultados de todas as diferentes diluições testadas para cada resíduo.	28
Figura 17. Comparação entre os valores de CB produzida pelos diferentes resíduos com factores de diluição óptimos, com os resíduos com 20 g/L de fonte de carbono e com as respectivas fontes de carbono maioritárias em meio HS.	29
Figura 18. Produção de CB a partir dos diferentes resíduos.	30
Figura 19. Variação do pH dos resíduos ao longo de 96 horas de produção de CB.	31
Figura 20. Produção de CB obtida nos meios contendo HSSL com diluição 1:4 e contendo os seguintes sais: 1- E.L. + KH ₂ PO ₄ ; 2- E.L.; 3- KH ₂ PO ₄ ; 4- (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 5- (NH ₄) ₂ SO ₄ + KH ₂ PO ₄ ; 6- Sem sais adicionados.	36
Figura 21. Produção de CB obtida nos meios contendo LFU com diluição 1:4 e contendo os seguintes sais: 1- E.L. + KH ₂ PO ₄ ; 2- E.L.; 3- KH ₂ PO ₄ ; 4- (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 5- (NH ₄) ₂ SO ₄ + KH ₂ PO ₄ ; 6- Sem sais adicionados.	37
Figura 22. Produção de CB obtida nos meios contendo SL com diluição 1:4 e contendo os seguintes sais: 1- E.L. + KH ₂ PO ₄ ; 2- E.L.; 3- KH ₂ PO ₄ ; 4- (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 5- (NH ₄) ₂ SO ₄ + KH ₂ PO ₄ ; 6- Sem sais adicionados.	38
Figura 23. Produção de CB obtida nos meios contendo RPB com diluição 1:4 e contendo os seguintes sais: 1- E.L. + KH ₂ PO ₄ ; 2- E.L.; 3- KH ₂ PO ₄ ; 4- (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 5- (NH ₄) ₂ SO ₄ + KH ₂ PO ₄ ; 6- Sem sais adicionados.	38

Figura 24. Gráficos FTIR de CB produzida a partir das fontes de carbono principais dos resíduos em meio HS.....	39
Figura 25. Gráficos FTIR de CB produzida a partir dos resíduos.....	40
Figura 26. Difrátogramas de raio-X das membranas de CB de meio HS referência e de licor de folhelho de uva.	41
Figura 27. Micrografia electrónica da membrana de CB obtida através do soro do leite.	42

Índice de Tabelas

Tabela 1. Propriedades da CB e da CV [9].....	6
Tabela 2. Concentração das fontes de carbono principais dos resíduos.....	26
Tabela 3. Diferentes parâmetros relativos à produção de CB.	32
Tabela 4. Fontes de carbono consumidas em cada resíduo.	34

1. Introdução

As crescentes preocupações ambientais originadas pelo aumento da poluição causada pela utilização de derivados do petróleo, associada às oscilações de preço e provável futura extinção das suas reservas naturais obrigam a determinadas mudanças no comportamento da sociedade actual. Uma delas consiste na transição da economia baseada em recursos fósseis, para uma economia predominantemente baseada em materiais renováveis como matérias-primas para a produção de produtos químicos e energia [1]. Por esta razão tem-se observado nos últimos anos um crescimento do investimento e da investigação na utilização de materiais derivados de recursos renováveis, na substituição dos materiais de origem petroquímica. Neste contexto, especial atenção tem sido dada aos polímeros com origem em materiais renováveis, que podem substituir os polímeros tradicionais derivados do petróleo num elevado número de aplicações. Entre os vários biopolímeros existentes, a celulose é um dos mais importantes e o mais abundante na Terra [2]. Normalmente, a celulose utilizada em processos industriais é de origem vegetal, sendo obtida a partir da madeira, mas também pode ser produzida por microrganismos como algas, fungos e bactérias, celulose bacteriana (CB). A principal desvantagem da CB em relação à celulose vegetal (CV) é o seu elevado custo de produção [3, 4]. No entanto, devido às suas características diferenciadas, existe actualmente um elevado interesse das indústrias na CB, resultando na procura de processos de produção mais económicos.

A fonte de carbono mais utilizada para a produção de CB é a glucose, no entanto, microrganismos, principalmente os pertencentes ao género *Gluconacetobacter*, são capazes de utilizar vários substratos como diferentes mono ou dissacarídeos, álcoois ou ácidos dicarboxílicos, por exemplo [3].

O objectivo deste trabalho foi avaliar a utilização de diferentes resíduos e/ou subprodutos industriais como fonte de carbono na produção de CB, visando encontrar novos substratos que substituam os tradicionais de modo a baixar os custos de produção. Avaliaram-se os seguintes subprodutos: o licor ao sulfito (HSSL), rico em xilose [5]; o licor de folhelho de uva (LFU), rico em galactose e glucose; soro do leite (SL), rico em lactose [6] e o resíduo de produção de biodiesel (RPB), rico em glicerol [7].

1.1. Celulose Vegetal

A celulose é o principal constituinte da biomassa vegetal, representando cerca de 1.5×10^{12} toneladas do total de biomassa produzida anualmente. Grande parte da biossíntese da celulose ocorre na parede celular das plantas, surgindo associada à lenhina, hemiceluloses e outras impurezas [8]. Além desta fonte existem ainda aquelas de origem animal, bacteriana, química e enzimática [8, 9].

A celulose é um polissacarídeo linear cuja fórmula química é $(C_6H_{10}O_5)_n$, formado por unidades de D-glucopirranose unidas por ligações $\beta(1-4)$ [8]. A celobiose é a unidade básica de repetição da cadeia de celulose e consiste em duas unidades de glucose anidra (Figura 1), em que uma unidade se encontra rodada 180° em relação ao plano [10].

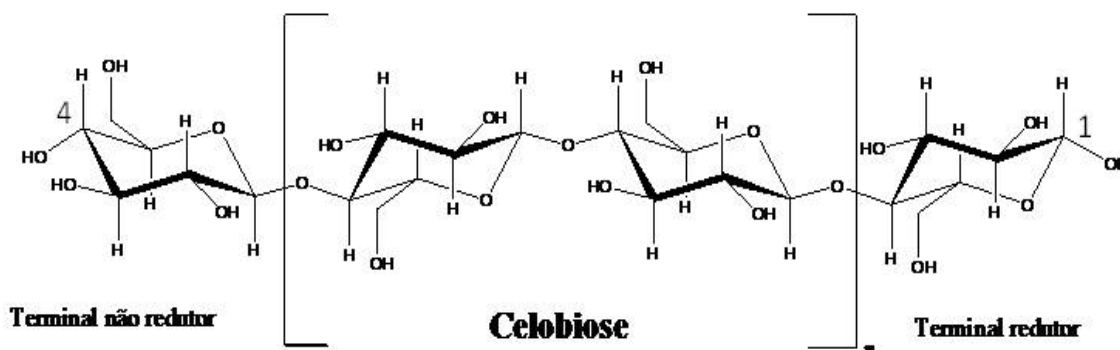


Figura 1. Estrutura molecular da celulose [10].

O grau de polimerização (DP) da CV pode atingir as 20000 unidades de β -D-glucopirranose, resultando num peso molecular bastante elevado, na ordem dos 10^6 ou superior. A celulose possui um baixo carácter redutor, devido a possuir uma única unidade de β -D-glucopirranose com propriedades redutoras, a extremidade que termina com um grupo OH no carbono 1 (Figura 1), que se encontra em equilíbrio com o aldeído correspondente. A extremidade não redutora termina com um grupo OH no carbono 4, do tipo álcool [8]. A celulose apresenta propriedades como hidrofiliabilidade, degradabilidade, quiralidade e uma elevada reactividade química que está essencialmente associada à presença de grupos OH. A geometria espacial deste arranjo linear de monómeros de β -D-glucopirranose ligados de forma covalente, dá origem a estruturas fibrilares extensas, com todos os grupos hidroxilo livres a participarem em ligações de hidrogénio intra ($O3-H \dots O5'$ e $O6 \dots H-O2'$) e inter-moleculares ($O6-$

H...O3) [10] (Figura 2). Desta forma agregados de várias cadeias de celulose formam camadas estabilizadas por forças de Van der Waals [8, 11].

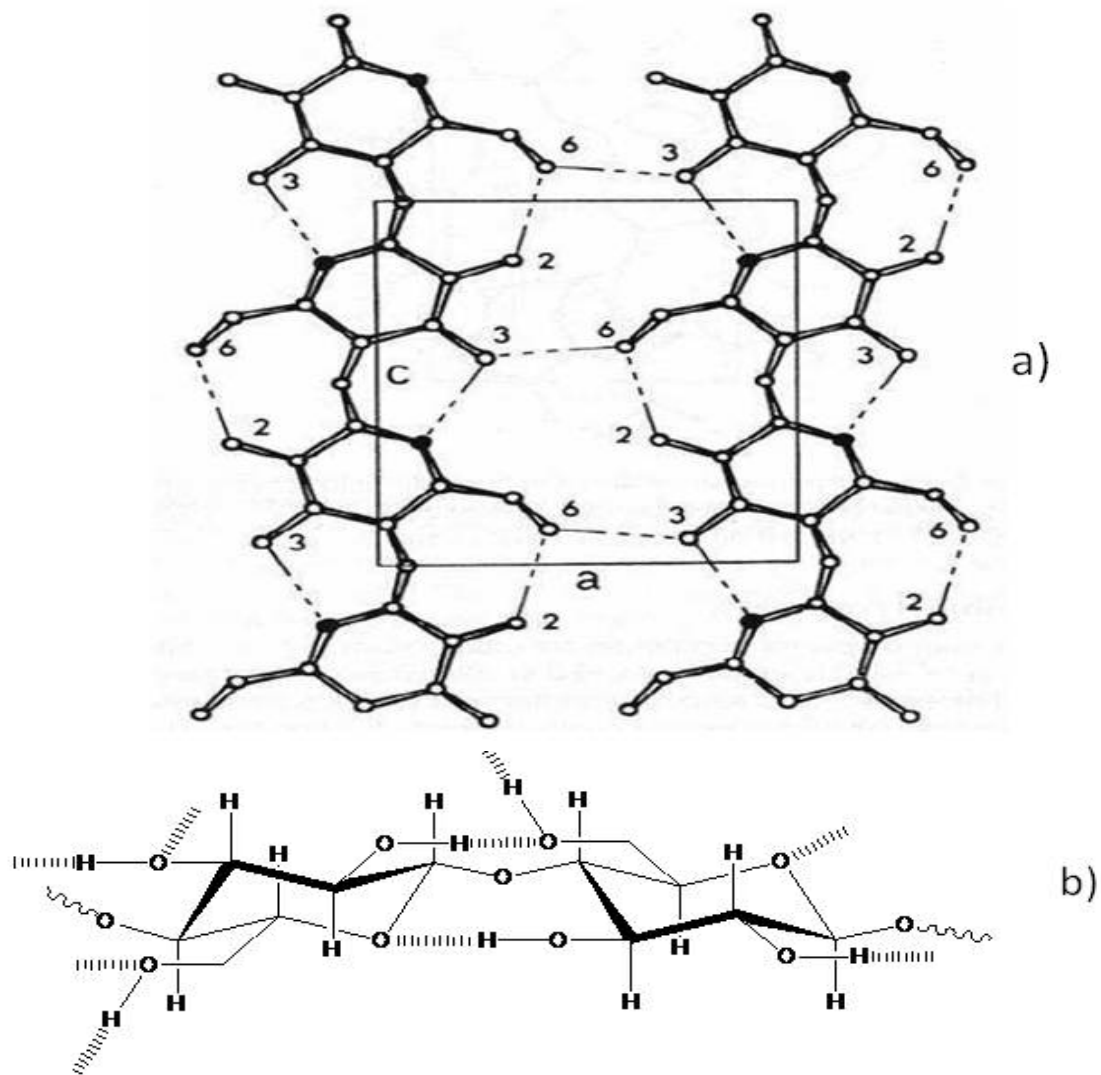


Figura 2. a) e b) representam as ligações intra e inter-moleculares na celulose [11].

A Figura 3 descreve a organização da parede celular fibrosa. As fibrilas elementares, representadas em D são constituídas por regiões amorfas intercaladas com regiões cristalinas, que se associam dando origem a microfibrilas (C). Estas, por sua vez, originam macrofibrilas (B) que são precursoras das fibras de celulose representadas em A. Na figura também estão representadas moléculas de celulose (E), células unitárias de celulose cristalina (F) e uma unidade de celobiose (G).

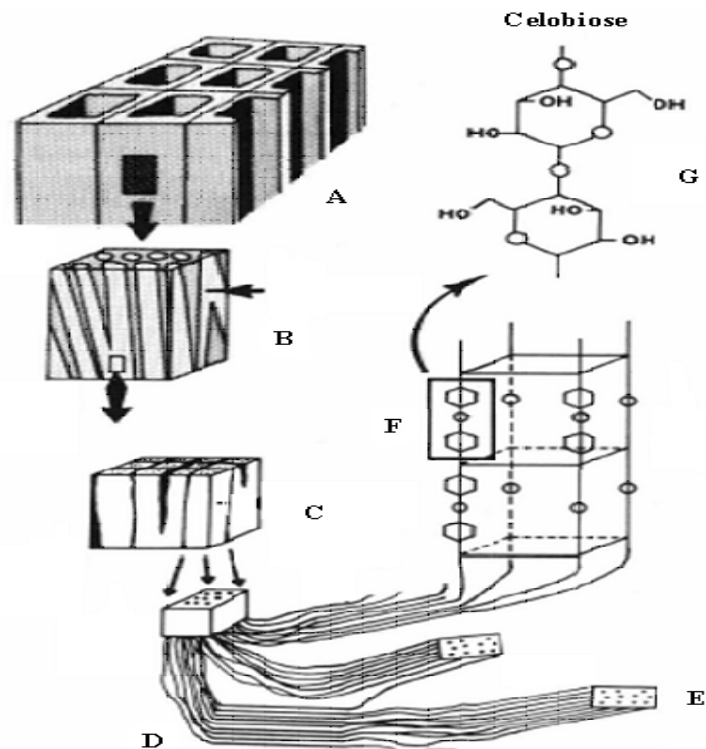


Figura 3. Organização da parede celular fibrosa. A – fibras de celulose; B – macrofibrilas; C – microfibrilas; D – fibrilas elementares; E – molécula de celulose; F – células unitárias de celulose cristalina; G – celobiose [12].

Na estrutura cristalina da celulose nativa (celulose I), as cadeias encontram-se dispostas de forma paralela (Figura 4). A celulose pode ainda existir noutras formas cristalinas, nomeadamente celulose II, III e IV, das quais a celulose II é a estrutura mais estável. Na celulose II as cadeias são anti-paralelas, sendo mais estável que a celulose I pois possui uma ligação adicional por cada resíduo de glucose (Figura 4). A celulose I é a forma mais abundante, sendo a celulose II uma forma rara que apenas se encontra em algumas espécies de algas e bactérias e que é essencialmente obtida a partir da celulose I por tratamento químico [13].

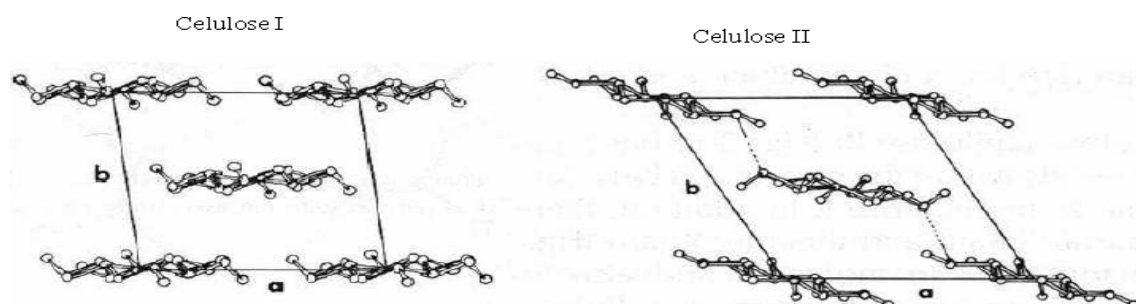


Figura 4. Projecções axiais das estruturas de celulose I e de celulose II.

A pasta celulósica produzida a partir da madeira é maioritariamente utilizada na produção de papel e papelão. No entanto, cerca de 2%, foi usado na produção de fibras de celulose regenerada e de filmes, bem como na produção de um elevado número de esteres e éteres de celulose, como por exemplo o nitrato de celulose ou a carboximetilcelulose (aproximadamente 3.2 milhões de toneladas em 2003) [8]. Estes derivados de celulose têm um elevado número de aplicações em várias áreas, sendo usados em revestimentos, laminados, filmes ópticos, como aditivos de materiais de construção, na indústria farmacêutica, alimentar ou cosmética [8]. Mais recentemente têm surgido novas aplicações para a celulose, devido à sua biocompatibilidade e quiralidade para a imobilização de proteínas, anticorpos e heparina, separação de moléculas enantioméricas, bem como para a produção de materiais compósitos com polímeros sintéticos e biopolímeros [8].

1.2. Celulose Bacteriana

A CB foi descrita pela primeira vez na literatura em 1886, por A.J. Brown [14]. Brown observou que alguns microrganismos utilizados para produção de ácido acético eram capazes de produzir uma membrana na superfície do meio de cultura na presença de glucose e de oxigénio e denominou-os como *Bacterium xylinum* [14]. Esta espécie, que pertence à família *Acetobacteriae*, foi, entretanto reclassificada taxonomicamente diversas vezes até à designação actual de *Gluconacetobacter xylinus* [15], embora muitas vezes seja ainda conhecida por *Acetobacter xylinum*. A espécie *G. xylinus* apresenta morfologia de bastonetes rectos ou ligeiramente curvos, alongados com um tamanho que varia entre $0.6-0.8 \times 1.0-4.0 \mu\text{m}$, podendo ser ou não móveis. Estes microrganismos são tolerantes a condições ácidas, Gram-negativos, estritamente aeróbios, não fotossintéticos, com uma temperatura óptima para crescimento entre os 15 e os 34°C, ocorrendo a sua morte térmica entre os 65 e os 70 °C [8]. *G. xylinus* pode ser encontrada na superfície de frutas e vegetais em decomposição, no vinagre ou em bebidas alcoólicas [15]. Estas bactérias produzem quantidades consideráveis de CB a partir de diferentes fontes de carbono e de azoto complexas [16]. Entre os microrganismos pertencentes ao género *Gluconacetobacter* destacam-se ainda como produtores de CB as espécies *G. xylinus* [17], *G. hansenii* [18] e *G. pasteurianus* [19]. Além destas, verificou-se que os géneros *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Salmonella*, *Pseudomonas* e *Alcaligenes* e *Sarcina ventriculi*, também produzem CB [16].

A estrutura química da CB é semelhante à da celulose vegetal $(C_6H_{10}O_5)_n$, no entanto apresenta propriedades físicas e mecânicas distintas. A CB tem um grau de pureza maior (devido a não estar associada a hemiceluloses e lenhina), um índice de cristalinidade mais elevado, uma força de tensão mais elevada, maior capacidade de absorção e de retenção de água, elevada elasticidade e maior adaptabilidade biológica [16, 20, 21]. Na Tabela 1 apresenta-se uma comparação entre as propriedades CB e da CV.

Tabela 1. Propriedades da CB e da CV [9].

Propriedades	CB	CV
Largura das fibras	0.07-0.13 μm	30-75 μm
Cristalinidade	65-79%	55-65%
Grau de Polimerização	2000 – 6000	13000 – 14000
Módulo de Young	15 – 30 GPa	5.5 – 12.6 GPa
Água	98.5%	60%

1.2.1. Morfologia da CB

No início da produção, as cadeias de CB agregam-se formando sub-fibrilas com uma largura de aproximadamente 1.5 nm. Estas sub-fibrilas agrupam-se com outras 36 sub-fibrilas semelhantes, originando uma fibrila elementar, com um diâmetro de aproximadamente 3.5 nm. Cerca de 46 fibrilas adjacentes juntam-se através de pontes de hidrogénio formando um *ribbon*, que é o nome dado às fibras de CB [9]. As dimensões destes *ribbons* variam consoante diferentes trabalhos estando compreendidas entre 0.003-0.004 (espessura) \times 0.07-0.13 μm (largura) [13, 22, 23], enquanto a largura das fibras de celulose produzidas através da madeira de bétula ou de pinho é 14-40 e 30-75 μm [24], esta diferença pode ser observada na Figura 1. Estes *ribbons* ultra finos que atingem comprimentos que variam entre 1 e 9 μm formam uma estrutura reticulada densa, que é estabilizada por pontes de hidrogénio [24]. O índice de cristalinidade é superior ao da CV, o DP é normalmente entre 2000-6000 [25], podendo em alguns casos atingir os 16000 ou 20000 [23], sendo que o DP médio da CV varia entre 13000 e 14000 [24, 26].

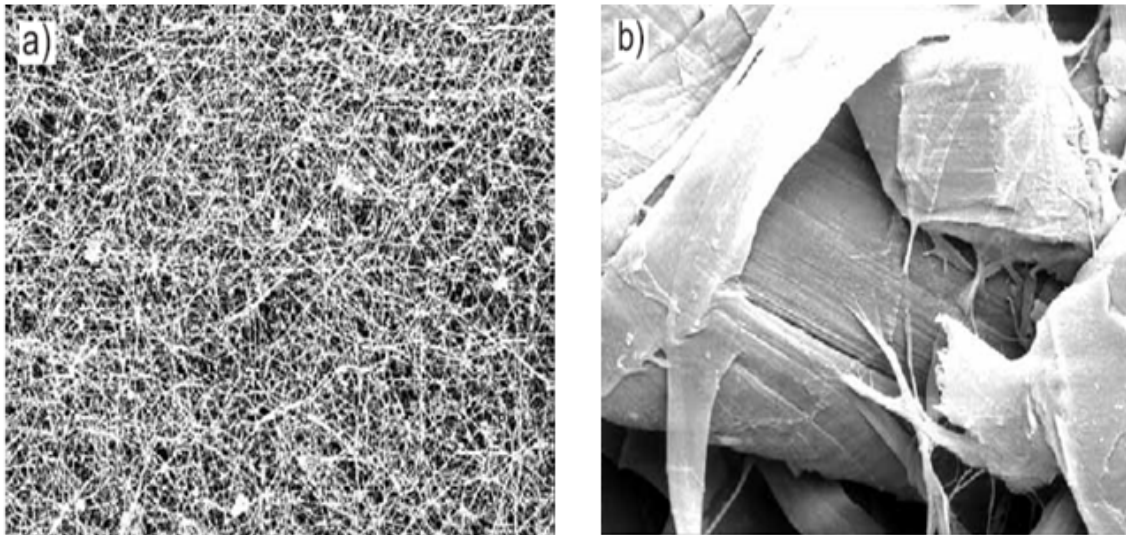


Figura 5. Organização microfibrilar de a) CB produzida por *G. xylinus* e b) pasta de madeira, ampliação 5000× [16].

A CB é produzida na forma de membrana gelatinosa (Figura 6), composta por 99 % de água [27], e quando seca assemelha-se a uma folha de papel translúcido com discreto brilho superficial, na Figura 7 está representada uma pequena porção de uma membrana de CB seca.



Figura 6. Membranas de CB em estado hidratado.



Figura 7. Porção de membrana de CB seca.

1.2.2. Aplicações

Tal como já foi referido anteriormente, as propriedades químicas e estruturais da CB diferenciam-na das da CV e conferem-lhe potencial para aplicação em várias áreas, incluindo a indústria alimentar, têxtil, farmacêutica e biomédica, papelreira, no tratamento de resíduos, entre outras [16, 28-30].

Uma das mais antigas e principais aplicações da CB é na alimentação, com a designação de nata de coco. Esta CB produz-se a partir da água ou leite de coco no sudeste asiático [16, 31]. Este produto alimentar é originário das Filipinas, datando o início da sua produção a 1949 e é bastante popular em outros países como o Japão, a Coreia ou os Estados Unidos. A camada espessa de celulose formada é cortada em cubos, lavada e fervida em água, antes de ser cozida em xarope de açúcar (Figura 8). Em 1992 a CB foi introduzida em bebidas light no Japão [16, 32].



Figura 8. Nata de coco [33].

A área biomédica é a área onde a CB apresenta maiores potencialidades, especialmente na medicina regenerativa. A CB pode ser utilizada como pele artificial temporária no curativo de feridas e queimaduras [16, 25]; implantes dentários [34, 35]; enxertos vasculares [34, 35]; membranas de diálise [35]; revestimento de *stents* (endopróteses expansíveis) cardiovasculares e crâneos [35]; membranas para regeneração de tecidos [16]; substituição de tecidos; transportador de fármacos com liberação controlada [16, 35]; próteses vasculares [36] ou como vasos sanguíneos artificiais [37]. A CB modificada para aplicação médica já é comercializada pela empresa brasileira Biofill que produz Bioprocess e Gengiflex, utilizados na cura de feridas [16]. Um outro produto baseado em CB, Prima Cel™, produzido pela Xylos Corp. (EUA), tem sido aplicado no tratamento de feridas e de úlceras [16].

Para além das áreas alimentar e biomédica, a CB pode ser aplicada em outros campos, como na indústria papelreira, como material de reforço, aumentando a resistência e protegendo a superfície do papel [38], ou na indústria da comunicação, na produção de diafragmas electroacústicos para auriculares (comercializado pela SONY), entre outras [16, 25].

1.3. Biossíntese

A produção de celulose em *G. xylinus* é associada ao crescimento celular, ou seja, os dois processos ocorrem em paralelo competindo pelos nutrientes fornecidos ao microrganismo [24]. A produção de CB consome cerca de 10% da energia gerada nas reacções catabólicas e não interfere nos processos anabólicos que ocorrem no meio

intracelular [11]. A biossíntese da CB é um processo que envolve vários passos, especificamente regulados por um número elevado de enzimas e de complexos de proteínas reguladoras e catalíticas. O processo de biossíntese da CB está dividido em duas partes fundamentais, a primeira é a síntese do precursor da celulose, a uridina difosfoglucose (UDPGlc), a segunda parte está relacionada com os mecanismos de polimerização [11, 16].

1.3.1. Síntese da UDPGlc

A utilização de determinado substrato para a produção de CB por *G. xylinus* pode ocorrer através de duas vias anfibólicas: a via das pentoses-fosfato para a oxidação de hidratos de carbono e o ciclo de Krebs para a oxidação de ácidos orgânicos e compostos relacionados [11]. Assim, a CB resulta de um metabolismo de hexoses fosfatadas, que é sustentado directamente através da fosforilação de hexoses exógenas ou indirectamente pela via das pentoses-fosfato ou pelo ciclo de Krebs, associados à gluconeogénese [11].

Foram definidos quatro passos enzimáticos principais (Figura 9), que expressam a via completa de conversão de glucose em CB [11], onde o precursor directo da celulose é a UDPGlc [11]:

- Fosforilação da glucose, originando a glucose-6-fosfato (Glc-6-P), pela glucocinase;
- Isomerização da Glc-6-P a glucose-1-fosfato, pela fosfoglucomutase;
- Conversão da Glc-1-P em UDPGlc, pela UDPGlc pirofosfatase.
- Conversão da UDPGlc em celulose pela enzima celulose sintetase [11].

Na Figura 9 estão representadas as vias bioquímicas para a produção de CB.

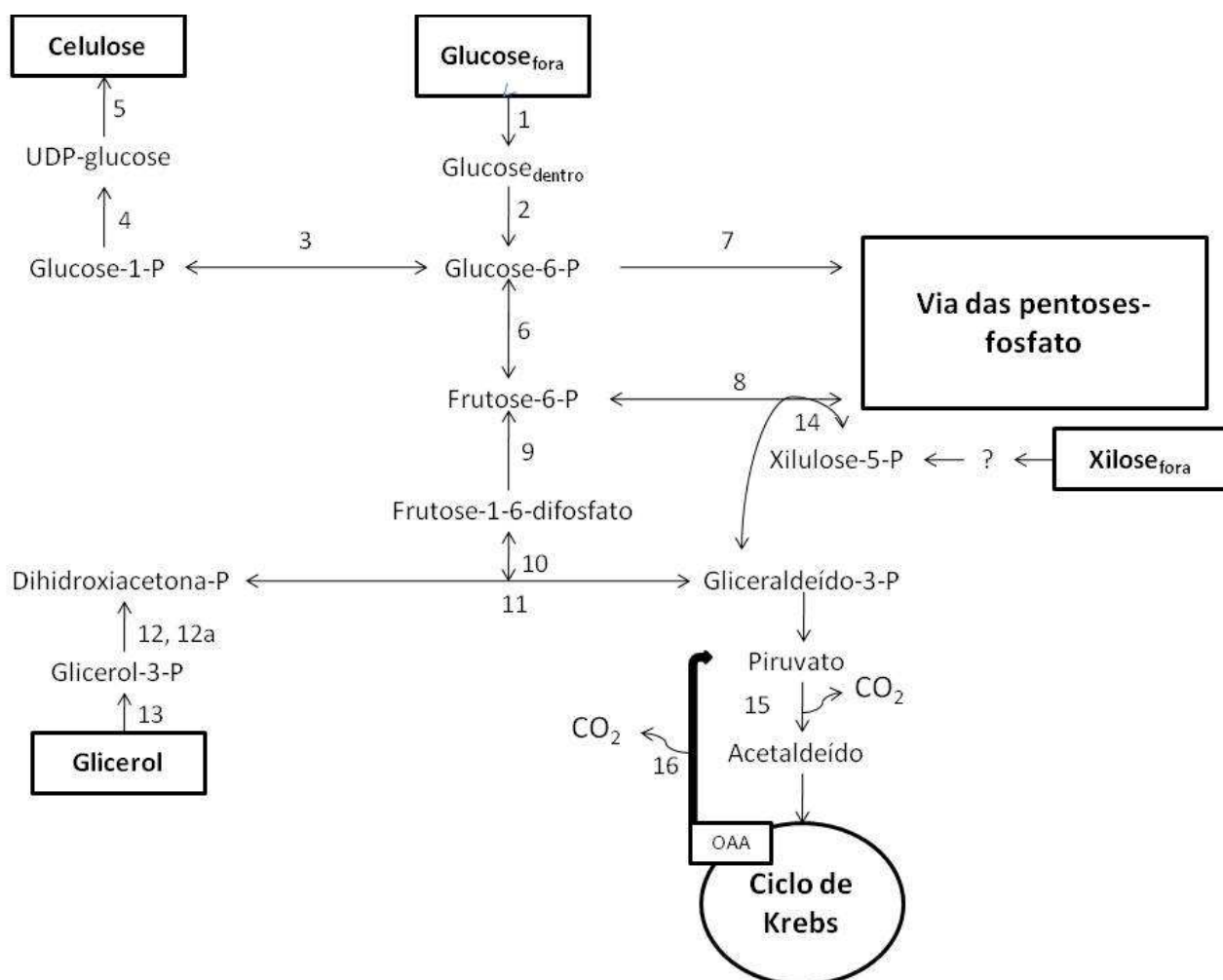


Figura 9. Vias bioquímicas para a produção de celulose bacteriana por *G. xylinus*. 1- glucose permease (EC 2.7.1.69); 2- glucocinase (ATP) (EC 2.7.1.2); 3- fosfoglucomutase (EC 5.3.1.9); 4- UDPGlc pirofosforilase (UTP) (EC 2.7.7.9); 5- celulose sintetase (EC 2.4.1.12); 6- fosfoglucoisomerase (EC 5.3.1.9); 7- glucose-6-fosfato desidrogenase (NADP) (EC 1.1.1.49); 8- transaldolase (EC 2.2.1.2); 9 - frutose difosfatase (EC 3.1.3.11); 10- aldolase (EC 4.1.2.13); 11- triose fosfato isomerase (5.3.1.1); 12- glicerol-3-fosfato desidrogenase (NAD) (EC 1.1.1.8); 12a- glicerol-3-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.8) (FAD); 13- glicerol desidroxiacetonaquinase (ATP) (2.7.1.30); 14- transcetolase (EC 2.2.1.1); 15- piruvato descarboxilase (EC 4.1.1.1); 16- oxaloacetato desidrogenase (EC 4.1.1.3); P- fosfato; OAA- oxaloacetato [11].

Os diferentes compostos utilizados como fonte de carbono neste estudo seguem vias distintas durante o seu metabolismo. A xilose é convertida em xilulose-5-fosfato, existindo um passo intermédio que não é ainda conhecido. Este composto dá origem ao gliceraldeído-3-fosfato (pela via das pentoses-fosfato), que origina frutose-1,6-difosfato, que é convertida em frutose-6-fosfato, através da enzima frutose difosfatase. O glicerol

é convertido em glicerol-3-fosfato, que dá origem à dihidroxiacetona fosfato. Este composto origina frutose-1,6-difosfato, que é convertida em frutose-6-fosfato.

Os três passos finais de biossíntese de celulose são idênticos para todas as fontes de carbono consideradas, que após serem convertidos em frutose-6-fosfato (intermediário comum à gluconeogénese e à via das pentoses-fosfato), seguem a via de síntese de celulose já referida (ver 1.3.1).

Até à data, não foi ainda descrito um sistema de transporte específico da lactose para o género *Gluconacetobacter* [39], tal como não se conhece nenhuma via metabólica proposta para a utilização deste dissacarídeo. No entanto, resultados de vários trabalhos nesta área mostram que este composto é uma fonte de carbono viável para a produção de CB [3, 25, 40, 41]. Para a galactose, um dos monómeros da lactose em conjunto com a glucose, também não foi ainda descrito um sistema de transporte específico para este género de bactéria.

Das várias enzimas que actuam neste processo, a UDPGlc pirofosfatase parece ser especialmente importante, visto que as espécies mutantes não produtoras de CB são principalmente deficientes nesta enzima, apesar de registarem actividade da enzima celulose sintetase (CS) [11, 16].

1.3.2. Mecanismo de polimerização

O processo de incorporação das unidades de UDPGlc é mediado pela enzima CS [11]. Esta enzima possui uma massa molecular de 400-500 KDa e aparece firmemente ligada à membrana citoplasmática, como se pode ver na Figura 10. Antigamente considerava-se que a síntese de CB ocorria extra celularmente, por ligação covalente entre os precursores de cadeia curta excretados da célula, mas hoje sabe-se que a polimerização de CB é um processo associado à membrana celular [11]. A polimerização das unidades de β -D-glucopiranosose é o primeiro passo na formação de CB, ocorrendo os restantes passos no espaço imediatamente exterior à parede celular.

A CS catalisa a polimerização de unidades de UDPGlc em cadeias glicosídicas β (1-4). A formação destas cadeias ocorre na membrana citoplasmática, como se pode ver na Figura 10. O mecanismo pelo qual este processo ocorre ainda não é completamente conhecido. Os resíduos de glucose são adicionados no terminal não redutor, sendo o polímero nascente libertado da célula a partir do seu terminal redutor. A existência de um intermediário lipídico na polimerização é um assunto que gera ainda discussão [11, 16].

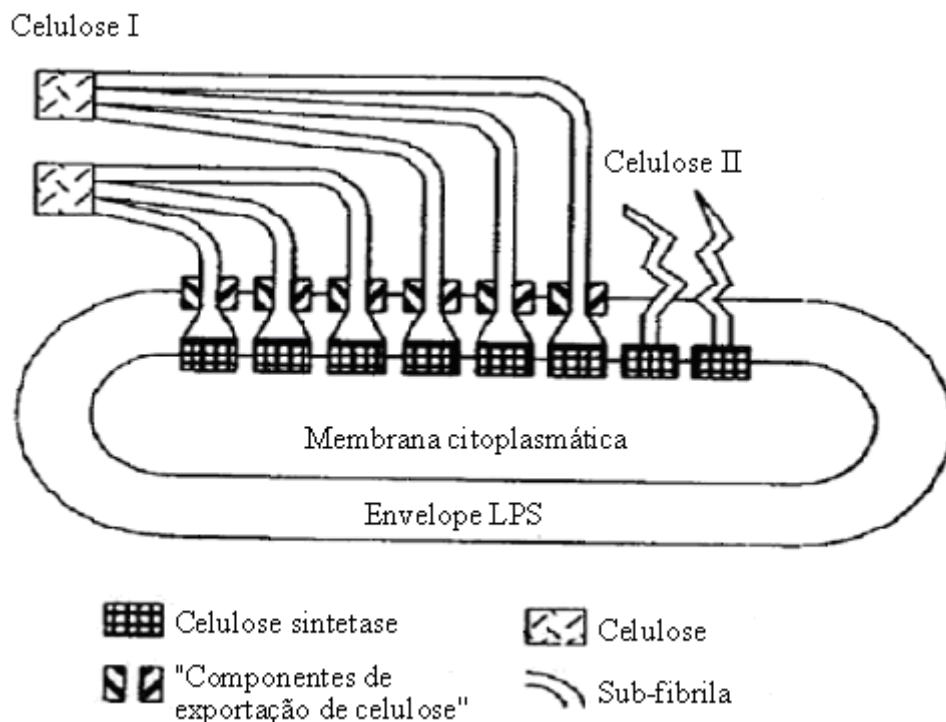


Figura 10. Montagem das microfibrilas de CB pela *G. xylinus* [16].

Através de microscopia electrónica verificou-se a existência de 50 a 80 locais semelhantes a poros, dispostos numa linha regular ao longo do eixo da membrana lipopolissacarídica, existindo uma justaposição com os *ribbons* celulósicos extra celulares. Estes locais estão representados na figura como *componentes de exportação de celulose*. Presume-se que estas estruturas sejam locais de extrusão para os polímeros pré-celulósicos, em grupos de 10 a 15 cadeias glicosídicas $\beta(1-4)$. Considera-se que estes agregados sejam as formas iniciais do produto celulósico, em vez de cadeias individuais. Estas estruturas originam as fibrilas elementares, que por sua vez dão origem aos *ribbons* [11, 16]. Este processo de montagem e de cristalização de cadeias é controlado pela célula, apesar de ocorrer no meio extra celular, a orientação e associação das cadeias glicosídicas, agregados, fibrilas elementares e *ribbons*, é aparentemente controlada pelo padrão original do local de extrusão [9, 11, 16].

1.4. Processos de produção em condição estática e agitada

A CB pode ser produzida tanto em cultura estática como agitada [16]. Em cultura estática, forma-se uma membrana de celulose à superfície do meio de cultura, na interface ar-líquido, com crescimento no sentido do meio [42], como se pode ver na

Figura 11 A). Em meio agitado a celulose aparece sob a forma de *pellets* irregulares dispersos no meio de cultura [42], como se pode ver na Figura 11 B).

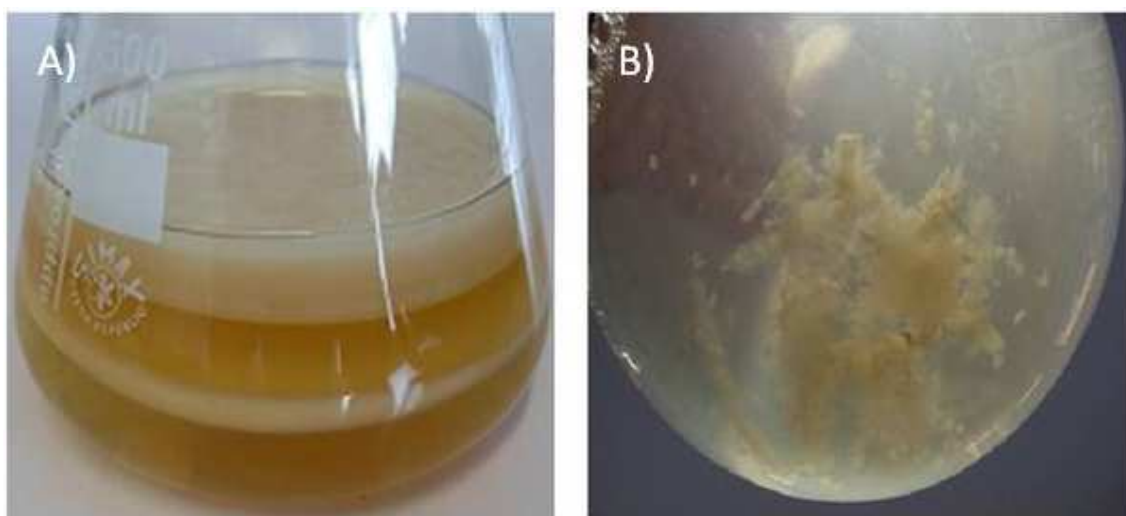


Figura 11. Celulose bacteriana produzida em meio estático (A)) e em meio agitado (B)), com a glucose como fonte de carbono.

A escolha entre produção em cultura estática ou agitada depende do destino final ou das aplicações da CB, uma vez que, não apenas a morfologia, mas também as propriedades físicas e mecânicas do polímero formado dependem do método de cultura [42]. A cultura estática foi já amplamente investigada e a celulose produzida sob a forma de membrana é utilizada em algumas das aplicações comerciais referidas anteriormente (ver 1.2.2).

Para produções em larga escala a produção em cultura agitada é considerada melhor devido à maior produtividade que teoricamente pode ser obtida. Apesar das vantagens em termos de rendimento, a produção de CB em cultura agitada apresenta alguns problemas. A produção de CB em fermentadores com agitação e arejamento constantes apresenta uma maior probabilidade de aparecerem espécies mutantes não produtoras de CB Cel^- , que contribuem para o decréscimo da produtividade [42]. O aparecimento destas espécies foi descrito primariamente por Hestrin e Schramm [43], que isolaram diferentes tipos de células de *Gluconacetobacter xylinus* que se distinguiram pela morfologia das colónias e pela capacidade de produção de CB:

- Cel^+ , capazes de produzir CB.
- Cel^- , espécies mutantes, não produtoras de CB, com ou sem capacidade de voltar a produzir CB [42].

As colónias de Cel^- são irregulares, achatadas, viscosas e com extremidades onduladas, ao contrário das do tipo Cel^+ que são esféricas, gelatinosas, convexas e com extremidades lisas (Figura 12) [42].

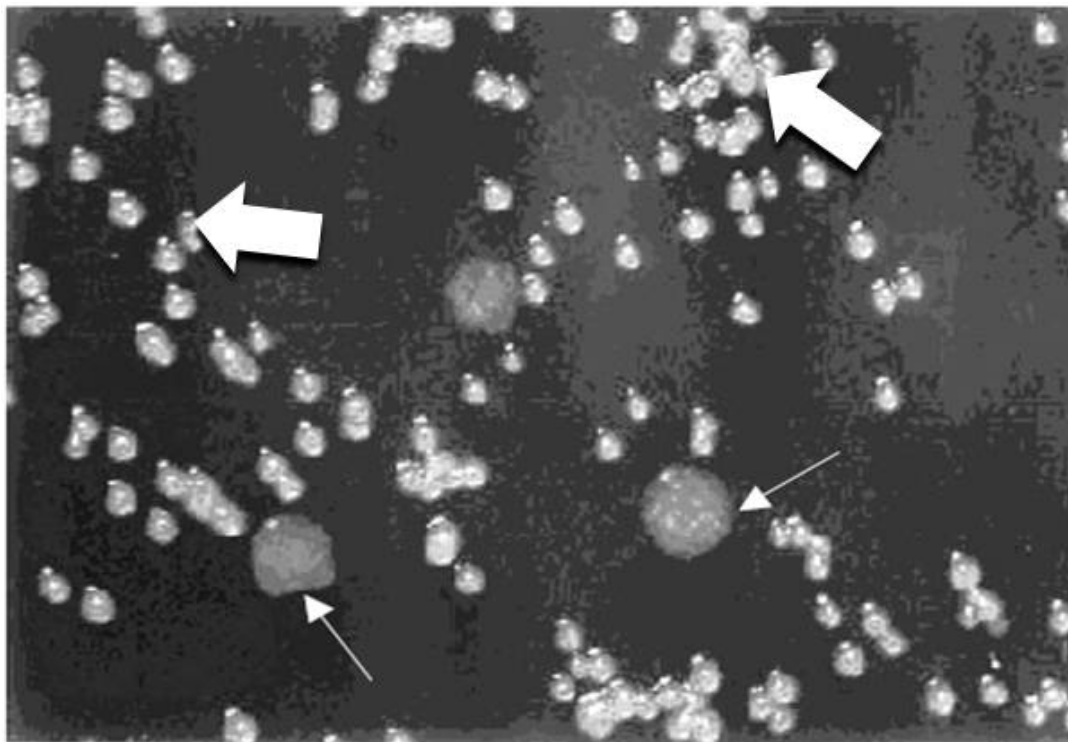


Figura 12. Morfologia das colónias de *A. xylinum* E₂₅. As setas finas indicam colónias não produtoras de celulose (Cel^-), as setas grossas indicam colónias produtoras (Cel^+) [42].

1.5. Produção de CB a partir de resíduos industriais

Nas fermentações microbianas, o meio de fermentação pode representar cerca de 30% do custo total do processo [44]. Então, um dos aspectos chave no processo fermentativo é o desenvolvimento de um meio de cultura de baixo custo de forma a diminuir o custo final do produto. A maioria dos estudos realizados nesta área é feita através de meios de cultura com açúcares puros como fonte de carbono. Para além disto os meios contêm ainda fontes complexas de azoto e vitaminas como extracto de levedura (E.L.) e peptona A 1 mL da solução que se pretende analisar adicionaram-se 1 mL da solução de DNS num tubo de ensaio que foi colocado a 100°C durante 5 min. Após os quais se adicionaram 8 mL de água destilada completando os 10 mL totais e de seguida é lida a absorvância da amostra [45-47]. Estes nutrientes tornam o meio economicamente desfavorável, porque são substratos muito caros. Os custos de

produção de CB podem ser significativamente reduzidos através da utilização de resíduos ou subprodutos industriais de baixo valor acumulado como substratos para a fermentação [48]. A maioria destes resíduos constitui fontes ricas de nutrientes que podem ser utilizados pelos microrganismos como matéria-prima para produção de novos materiais.

Resíduos da indústria de produção vinho ou do leite, entre outros, correspondem a uma elevada carência química de oxigénio, devido ao seu volume, composição e carga orgânica, o que significa que não podem ser lançados directamente na natureza [39, 49]. Isto obriga a que os resíduos necessitem de tratamento antes do seu envio para os sistemas de esgotos, contribuindo com mais um custo de processo elevado para as empresas que os produzem. Assim, a recuperação destes resíduos como fontes de nutrientes contribui não só para a valorização dos próprios resíduos mas também mas também à resolução de um problema ambiental.

Diversos trabalhos de produção de CB a partir de substratos de baixo valor acumulado foram já realizados, na tentativa de diminuir custos de produção, utilizando sumos de frutas e resíduos ou subprodutos industriais. A partir de sumos de coco e de ananás, ambos suplementados com E.L. e etanol, produziu-se CB em cultura estática, cerca de 500 g/L (peso húmido) após 14 dias de cultivo [50]. Também após 14 dias de cultivo produziram-se cerca de 0.5 g/L de CB a partir de sumos de maçã, ananás, pêra japonesa ou uva e 2.1 g/L a partir de sumo de laranja. Conseguiram-se obter elevadas quantidades de CB a partir de sumo de laranja (6.9 g/L) e ananás (3.9 g/L) suplementados com fontes de azoto, 2.0 % de peptona, 0.5 % de E.L e 0.12 % de ácido cítrico [51]. A quantidade de CB produzida a partir dos resíduos de sumo de casca de laranja foi 0.04 g/L e 0.13 g/L, respectivamente [51]. A partir do meio composto por pó de Konjac suplementado com E.L. e triptona, foi atingida uma produção de CB de 2.1 g/L após 23 dias de incubação [20]. Um efluente do processamento da batata com baixo conteúdo de sólidos, sem alterações, apenas diluído foi utilizado para a produção de CB, obtendo-se 5.8 g/L após 14 dias de incubação [52]. A partir da mistura de melaço e de água de maceração do milho (fonte de azoto) formaram-se 4.7 g/L de CB após 6 dias de incubação [2] e 3.1 g/L após 8 dias num agitador rotativo [48].

Como se pode ver pelos exemplos citados da literatura todos os resíduos foram suplementados com outras fontes de nutrientes, como o E.L. e a peptona, que embora contribuam para a produção de CB podem resultar num aumento dos custos de

produção. Por esta razão deve ser feita uma análise à relação custo/benefício para os resíduos escolhidos, pois muitos deles embora ricos em fonte de carbono são pobres nos restantes nutrientes necessários à sobrevivência dos microrganismos.

O objectivo deste trabalho foi avaliar diferentes resíduos e/ou subprodutos industriais visando encontrar novos substratos que substituam as fontes de carbono convencionais para a produção de CB e que contribuam para a redução do preço final. Por essa razão escolheram-se alguns resíduos provenientes da indústria agro-florestal portuguesa, como o licor de cozimento ao sulfito, rico em xilose [5]; o licor de folhelho de uva, rico em galactose e glucose e o resíduo de produção de biodiesel [53], rico em glicerol. Até à data nenhuma destas matérias-primas foi ainda testada como fonte de nutrientes para produção de CB. Uma quarta matéria-prima foi ainda escolhida, o soro do leite, rico em lactose, embora a sua utilização para a produção de CB já tenha sido descrita em trabalhos anteriores [39, 52], devido ao impacto da indústria de produção de queijo em Portugal.

O licor de cozimento ao sulfito é um subproduto originado pelo processo de produção de pasta ao sulfito ácido. A composição química deste depende do tipo de madeira utilizado no processo. A matéria orgânica obtida a partir do processo ao sulfito ácido de madeira de resinosas (SSSL) consiste essencialmente de linhossulfonatos solúveis em água e hexoses originárias da hidrólise de glucomananas. Os componentes orgânicos maioritários do licor ao sulfito de madeira de folhosas (HSSL) são linhossulfonatos e pentoses obtidas a partir da hidrólise de glucoronoxilanas, sendo este o tipo de licor utilizado neste trabalho. O uso do licor ao sulfito como matéria-prima na produção de produtos de valor acrescentado leva a um aumento da sustentabilidade das fábricas de produção de pasta, bem como à diminuição da dependência de recursos fósseis. As pentoses derivadas da hidrólise das glucoronoxilanas podem ser usadas na produção de biocombustíveis de segunda geração, como o bioetanol, utilizando a levedura *Pichia stipitis* [5].

O folhelho de uva, resultante de bagaço de uvas brancas cedido pela Quinta do Serrado, de Penalva do Castelo, em Outubro de 2008, foi a matéria-prima utilizada na preparação do licor. O folhelho foi caracterizado quanto ao seu teor de cinzas (7.8 %), extractáveis em acetona (5.7 %), diclorometano (5.5 %) e água (26.4 %), proteínas (18.8 %), taninos (13.8 %), resíduo insolúvel em ácido a 72 % (22.4 %), celulose Kürschner e Höffer (20.8 %) e hemiceluloses (24.9 %). A análise de açúcares neutros mostrou que é essencialmente constituído por celulose, mas também por mananas, arabinanas, xilanas

e xiloglucanas [54]. O licor do folhelho de uva utilizado neste trabalho resulta da extracção com água do folhelho de uva [54].

O soro do leite é o líquido que permanece após o processo de precipitação e remoção da caseína do leite durante o processo de fabrico do queijo. Este produto secundário retém cerca de 55% dos nutrientes do leite, sendo os mais abundantes a lactose (4.5-5 %), proteínas (0.6-0.8 %), lípidos (0.4-0.5%) e sais minerais (8-10% do extracto seco) [6]. O soro tem alta carência bioquímica em oxigénio ($> 30 \text{ Kg m}^{-3}$) e elevada carência química em oxigénio ($> 60 \text{ Kg m}^{-3}$) [39]. Por esta razão deve sofrer tratamento antes de ser descartado para os sistemas de esgotos. O descarte do soro do leite é um problema ambiental sério. Microrganismos como as *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Saccharomyces*, *Xanthomonas* e *Lactobacillus* foram isolados [55], adaptados [56], mutados [57], ou geneticamente manipulados [58], de forma a utilizarem o soro do leite para gerar produtos de fermentação úteis como goma gelana, etanol, goma xantana ou ácido láctico [6].

O biodiesel pode ser produzido a partir de uma variedade de matérias-primas. Estas incluem óleos vegetais (por exemplo soja, palma, amendoim, girassol, coco), gorduras animais, bem como óleos residuais, como óleo de fritar usado. Na produção de biodiesel as matérias-primas são sujeitas a uma reacção de transesterificação. Os óleos vegetais e as gorduras animais reagem com um álcool, na presença de um catalisador (normalmente uma base), originando os ésteres alquílicos correspondentes aos diferentes ácidos gordos encontrados nas gorduras e nos óleos. O principal subproduto desta reacção é o glicerol [7, 59]. O rápido crescimento da produção de biodiesel dá origem a um resíduo (RPB) que contém cerca de 90% de glicerol, pequenas quantidades de metanol, NaOH, alguns ésteres e ácidos gordos, e quantidades reduzidas de compostos de enxofre, proteínas e minerais [60]. Estes compostos impedem a utilização deste resíduo nas aplicações tradicionais do glicerol (indústria alimentar ou farmacêutica), a não ser que sejam efectuados processos de purificação dispendiosos [60]. Este resíduo tem custos de eliminação associados, sendo, por isso necessário encontrar novas de valorização. Recentemente tem sido testada a utilização deste resíduo como substrato para a produção de polímeros microbianos [53, 60].

2. Materiais e métodos

2.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi isolado a partir de uma bebida tradicional do sudeste asiático, comercializada com o nome de chá de Kombucha e encontra-se sob processo de identificação no GenBank, Alemanha.

2.2. Meio de Cultura

O meio de cultura utilizado para produção e manutenção da estirpe foi o meio Hestrin e Schramm (HS) composto em g/L por glucose, 20, extracto de levedura, 5, peptona bacteriológica, 5, Na_2HPO_4 , 0.68 e ácido cítrico 1.15 [43]. O pH foi ajustado a 4.5 ± 0.1 com ácido acético diluído 1:1 (v/v) para os ensaios de produção em meio líquido e ajustado a 5.8 ± 0.1 para os meios sólidos destinados à manutenção da cultura.

2.3 Ensaios efectuados e amostragem

2.3.1 Inóculo

A suspensão de bactérias utilizada para inocular os meios de cultura foi preparada a partir de uma única colónia retirada de meio HS sólido e cultivada durante 48 h em meio HS líquido, a 30 °C sem agitação. O volume do inóculo utilizado em relação ao meio de cultura foi de 10 % (v/v). O inóculo foi efectuado em condições de esterilidade, em câmara de fluxo laminar. Os Erlenmeyers inoculados foram incubados a 30 °C, em condições estáticas.

2.3.2 Produção de CB em meios de cultura referência

Para cada um dos resíduos testados preparou-se um meio referência simplesmente substituindo a glucose do meio HS pela mesma concentração (20 g/L) de cada uma das fontes de carbono maioritárias presentes nos resíduos, xilose, glucose+galactose (1:1), lactose e glicerol. Foi também realizado um ensaio com meio HS com glucose. O pH dos meios foi ajustado a 4.5 ± 0.1 com ácido acético diluído 1:1 (v/v). Prepararam-se Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio. Os açúcares foram autoclavados separadamente. Amostras de CB foram retiradas após 24, 32, 48, 56, 72 e 96 horas de cultivo. Foram também retiradas amostras de meio de cultura para quantificação de fonte de carbono consumida e medido o pH do mesmo. Cada

amostragem foi representada por um Erlenmeyer por não ser possível recolher diversas amostras homogêneas de celulose a partir de um único Erlenmeyer.

2.3.3 Produção de CB a partir dos resíduos

Para cada resíduo foram testadas diferentes diluições: para HSSL 1:1.5, 1:4 e 1:10; para o LFU 1:2, 1:4 e 1:10; para o SL 1:4, 1:20, 1:50 e 1:100; para o RPB 1:4, 1:25, 1:50 e 1:100. Nestes ensaios foram apenas retiradas amostras de CB produzida após 96 horas de cultivo.

Foram realizados ensaios com os resíduos nas seguintes diluições: HSSL 1:4; LFU 1:4; SL 1:50 e RPB 1:25. Nestes ensaios foram retiradas amostras da mesma forma que para os meios de cultura referência (ver 2.3.2).

Aos diferentes resíduos, na mesma diluição que no ensaio anterior, foram adicionados componentes orgânicos e/ou inorgânicos na seguinte concentração: extracto de levedura, 4 g/L, com KH_2PO_4 , 2g/L; extracto de levedura, 4 g/L; KH_2PO_4 , 2 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3.3 g/L; KH_2PO_4 , 2 g/L com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3.3 g/L. Para cada resíduo foi ainda preparado um meio sem adição de qualquer componente, na mesma diluição que no ensaio anterior. Nestes ensaios foram apenas retiradas amostras de CB após 96 horas de cultivo.

2.4. Lavagem e purificação

As membranas de CB removidas do meio de cultura foram lavadas três vezes com NaOH 0.5% a 80°C durante meia hora. De seguida lavou-se com água destilada até neutralização do pH. De forma a quantificar a CB produzida, as membranas foram colocadas numa estufa, a 100 °C, até peso constante, sendo determinada a concentração em gramas de CB seca por litro de meio de cultura (g/L).

2.5. Quantificação de fontes de carbono

A quantidade de fonte de carbono principal presente em cada resíduo e nas amostras retiradas durante os ensaios efectuados com resíduos e dos meios convencionais, excepto HS com glucose, glucose glucose+galactose, glicerol e resíduo de produção de biodiesel, foram analisadas por HPLC. As amostras foram analisadas usando uma coluna de troca iónica 10 µm Eurokat (Knauer), 300 x 7.5 mm, e um detector de índice de refração Gilson 131. O eluente, uma solução aquosa de ácido sulfúrico (0.01M), foi bombeado com uma taxa de fluxo de 0.4 mL/min (25 °C). O

volume injectado foi 20 μL . Todas as amostras foram centrifugadas e filtradas com filtros de 0.22 μm anteriormente à análise. Foram efectuadas curvas de calibração utilizando padrões contendo as fontes de carbono principais com concentrações entre 0.5 e 20 g/L.

A quantificação da fonte de carbono consumida nos meios HS com glucose e glucose+galactose foi efectuada pelo método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). A 1 mL da solução que se pretende analisar adicionaram-se 1 mL da solução de DNS num tubo de ensaio que foi colocado a 100°C durante 5 min. Após os quais se adicionaram 8 mL de água destilada completando os 10 mL totais e de seguida é lida a absorvância da amostra a 540 nm. Foi construída uma curva padrão de glucose com concentrações entre 0.2 e 1.0 g/L, a partir da qual foi calculada a quantidade de fonte de carbono consumida nos meios referidos.

Para quantificação do glicerol foi usado o kit específico para quantificação deste composto (*Free Glycerol Reagent, Sigma-Aldrich*). Este reagente quando combinado com o glicerol origina um composto detectado a 540 nm cuja absorvância é directamente proporcional à concentração de glicerol. Foi construída uma curva padrão com concentrações entre 0.02 e 0.2 mg/mL. A 30 μL de amostra foram adicionados 300 μL de solução de reagente. As concentrações de glicerol foram determinadas comparando as absorvâncias a 540 nm com a curva padrão.

2.6. Caracterização da CB

As amostras de CB utilizadas para as análises de caracterização foram membranas obtidas durante o processo de produção, purificadas e secas em estufa.

2.6.1. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR foram obtidos num espectrómetro Perkin Elmer FTIR System equipado com uma única célula horizontal Golden Gate ATR. Foram adquiridos 32 scans na gama 4000-600 cm^{-1} com uma resolução de 4 cm^{-1} .

2.6.2. Difração de Raio-X

A análise da difracção de raio-X das membranas de CB foi feita em um difratómetro Philipps X'Pert MPD usando uma fonte Cu-K α ($\lambda = 0.154 \text{ nm}$) no intervalo $2\theta = 2 - 40^\circ$, com uma velocidade de scan de 0.02°/scan. O índice relativo de cristalinidade foi estimado pelo método de Segal [61], usando a seguinte equação:

$$CrI^{XRD} = [(I_{002} - I_{am}) / I_{002}] \times 100$$

Onde I_{002} é a intensidade do pico correspondente ao plano (002) a $2\theta = 22.8^\circ$ para celulose I, e I_{am} é a intensidade do pico da fracção amorfa $2\theta = 18^\circ$ para celulose I.

2.6.3. Microscopia electrónica de varrimento (SEM)

As micrografias de microscopia electrónica de varrimento da superfície dos filmes de CB foram obtidas em um equipamento Hitachi SU-70 operando a 15kV, utilizando amostras revestidas de carbono.

2.7. Cálculos

O rendimento de CB/substrato foi determinado da seguinte forma:

$Y_{CB/S} = \frac{\Delta CB}{\Delta S}$ (g/g), onde ΔCB é a quantidade de CB produzida e ΔS é a quantidade de substrato consumido.

O grau de conversão de substrato (α) calculou-se utilizando a seguinte expressão:

$\alpha = \frac{\Delta S}{S_i} \times 100$, onde S_i é a concentração inicial de substrato.

A taxa de produção de CB foi expressada da seguinte forma:

$r_{CB} = \frac{\Delta CB}{t_c}$, onde t_c é o tempo de produção.

3. Resultados e Discussão

3.1. Produção de CB utilizando meios referência

Para testar a eficiência da produção de CB dos resíduos ou subprodutos da indústria agro-florestal portuguesa utilizados neste trabalho, os primeiros ensaios foram realizados utilizando-se meio HS contendo os compostos referência, isto é, as fontes de carbono principais presentes em cada resíduo. Desta forma, a glucose do meio HS foi substituída pela mesma concentração de xilose, glu+gal, lactose ou glicerol, principais fontes de carbono do HSSL, LFU, SL e do RPB, respectivamente. Na Figura 13 está representada a evolução da produção de CB, com os diferentes meios, ao longo das 96 horas de experiência.

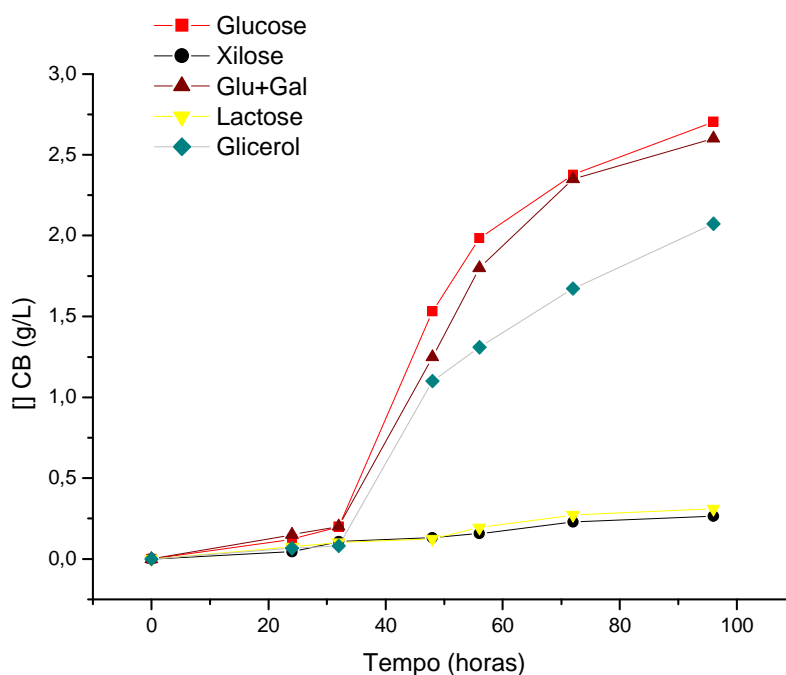


Figura 13. Evolução da produção de CB nas experiências com glucose, xilose, glu+gal, lactose e glicerol em meio HS.

A maior quantidade de CB produzida foi obtida nas experiências com os meios HS contendo glucose e glu+gal, respectivamente, 2.70 e 2.60 g/L de CB após 96 horas de cultivo. Na experiência com glicerol foi obtida uma quantidade de CB de 2.10 g/L. As quantidades mais baixas foram obtidas nas experiências com lactose e xilose, aproximadamente 0.31 e 0.26 g/L, respectivamente. Estes resultados, de uma forma

geral, estão de acordo com os resultados descritos na literatura, onde são utilizados diversos monossacarídeos (glucose, frutose, xilose, manose e ribose), dissacarídeos (lactose, maltose e ribose) e alcoóis (etanol, glicerol e inositol) como fontes de carbono para a produção de CB com diferentes espécies de bactérias do género *Gluconacetobacter*. Nestes trabalhos, todos os compostos puros foram capazes de produzir CB. Keshk *et al.* [3] realizaram um trabalho deste género, onde foi obtida uma quantidade de CB de 0.83 g/L no meio HS com glucose. Neste trabalho o melhor resultado foi obtido com o glicerol, 1.30 g/L, no entanto, existem outros trabalhos em que a produção com glicerol é ligeiramente inferior à da glucose [25]. A quantidade de CB produzida por Keshk *et al.* [3] a partir da lactose e da xilose foi reduzida, 0.18 g/L e 0.31 g/L respectivamente. Estes valores são da mesma ordem de grandeza que os valores obtidos no presente trabalho com os referidos açúcares. A baixa quantidade de CB produzida justifica-se pelo facto de tanto a xilose como a lactose não serem facilmente metabolizadas pela *G. xylinus*. [39, 62] Em relação aos resultados obtidos com a glucose e com o glicerol, os resultados obtidos no presente trabalho foram ligeiramente superiores aos resultados descritos na literatura, o que poderá ser explicado pela maior razão superfície/volume [25]. Keshk *et al.* [3] prepararam 30 mL de meio de cultura em erlenmeyers de 100 mL, enquanto neste trabalho foram usados 50 mL de meio em erlenmeyers de 250 mL. Em relação à mistura de glucose e galactose, não é possível comparar o valor porque não foram encontrados trabalhos realizados com as duas fontes de carbono em simultâneo. No entanto, existem dados para a galactose separadamente, Keshk *et al.* [3] alcançaram um resultado de 0.20 g/L.

As curvas de produção da glucose, glu+gal e do glicerol apresentaram andamentos semelhantes nas primeiras 32 horas, durante as quais a produção foi muito reduzida. Entre as 32 e as 48 horas ocorreu um aumento substancial, sendo este o intervalo de tempo em que a taxa de produção foi máxima, 0.083 g/L.h para a glucose, 0.065 g/L.h para a glu+gal e 0.064 g/L.h para o glicerol. Entre as 48 e as 96 horas, a taxa de produção tende a diminuir nas três experiências. Tal como foi referido a quantidade de CB produzida a partir da lactose e da xilose foi muito reduzida, não se verificando nenhuma variação significativa no gráfico da CB produzida ao longo do tempo.

Ao mesmo tempo em que foram colhidas as membranas, foi medido o pH do meio, de forma a avaliar a variação de pH. A Figura 14 representa esta variação para cada um dos substratos estudados.

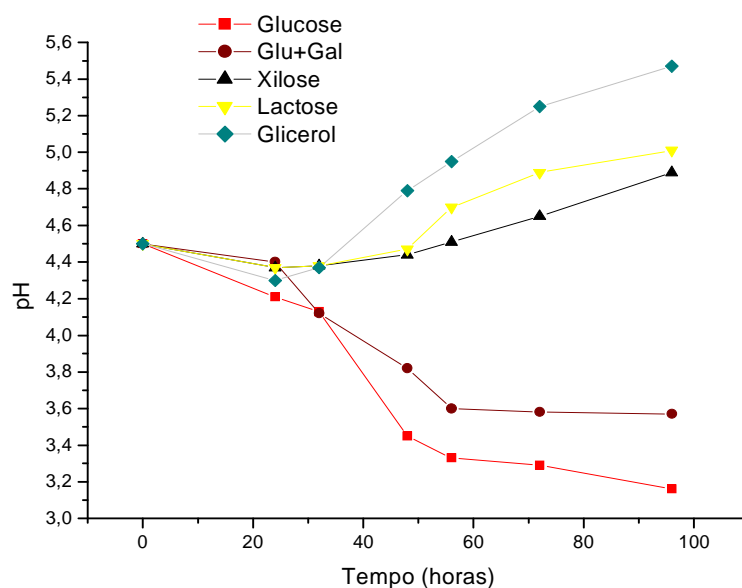


Figura 14. Variação do pH dos meios sintéticos ao longo de 96 horas de produção de CB.

O pH dos meios contendo glucose e glu+gal como fontes de carbono decresceu ao longo do tempo. Isto poderá ter resultado de as bactérias do género *Gluconacetobacter* serem capazes de converter hidratos de carbono em ácido acético durante o metabolismo respiratório, que envolve a oxidação do etanol a ácido acético e a conversão de glucose em ácido glucónico [16]. Verificou-se ainda que pH abaixo de 4 tem um efeito negativo na produção de CB, pois observa-se para os ensaios com glucose e glu+gal um abrandamento da produção de CB abaixo deste valor. Para os restantes meios o pH aumentou ligeiramente, no entanto, permanecendo na gama óptima de pH para a produção de CB que é entre 4 e 6 [16].

3.2. Produção de CB a partir de resíduos

Numa fase inicial as experiências utilizando os resíduos industriais seleccionados, foi testada apenas com estes diluídos em água de modo a obter inicialmente uma concentração de 20 g/L correspondente à quantidade de glucose presente no meio HS. Por esta razão foi necessária a determinação da concentração da fonte de carbono maioritária em cada resíduo de forma a seleccionar as diluições correctas.

3.2.1. Quantificação das fontes de carbono principais

Na Tabela 2 apresentam-se os resultados da quantificação das fontes de carbono principais dos resíduos.

Tabela 2. Concentração das fontes de carbono principais dos resíduos.

Resíduo	Concentração (g/L)					Total (g/L)
	Glucose	Lactose	Glicerol	Xilose	Galactose	
HSSL	-	-	-	24.6	-	24.6
LFU	18.0	-	-	-	20.2	38.2
SL	-	149.2	-	-	-	149.2
RPB	-	-	1117	-	-	1117

O HSSL continha 24.6 g/L de xilose. O LFU apresentava concentrações próximas de glucose e galactose, 18.0 e 20.2 g/L respectivamente. O SL apresentava uma concentração de 149.2 g/L de lactose. O RPB tinha uma concentração elevada de glicerol, 1117 g/L. As diluições a utilizar para cada resíduo foram seleccionadas a partir destes valores de concentração de forma a que a concentração final no início de cada experiência fosse de 20 g/L, a concentração da glucose no meio HS. As diluições seleccionadas foram, 1:1.5 para o licor ao sulfito, 1:2 para o licor de folhelho de uva, 1:4 para o soro do leite e 1:50 para o resíduo de produção de biodiesel. No caso do soro do leite, foi esta a diluição escolhida porque numa quantificação inicial da lactose presente no soro, foi obtido um resultado de 100 g/L.

Na Figura 15 as quantidades de CB obtidas nos ensaios com resíduos são comparadas com os resultados obtidos com as respectivas referências.

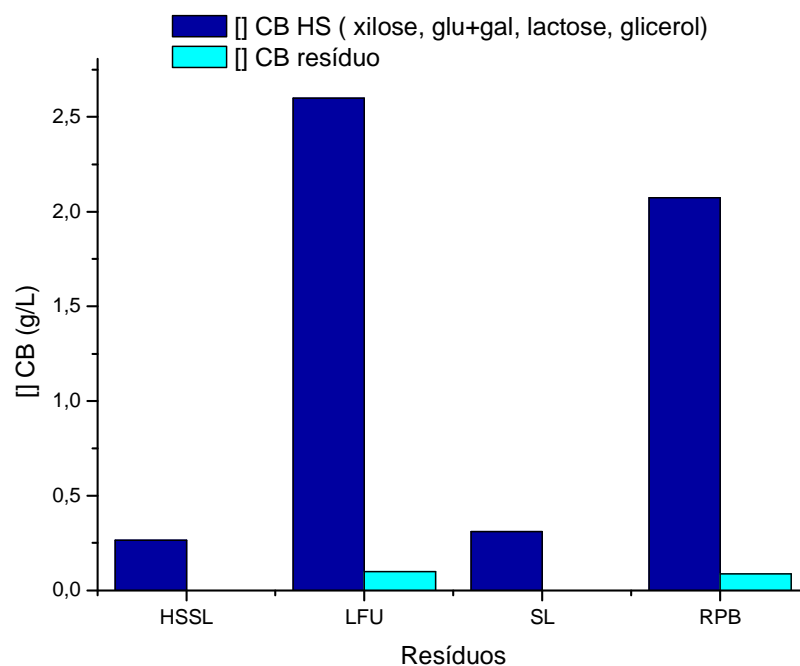


Figura 15. Quantidades de CB obtidas nas experiências utilizando resíduos comparadas com as obtidas pelas referências.

Os resultados obtidos nestas experiências preliminares com os resíduos industriais mostraram que para uma concentração de aproximadamente 20 g/L de substrato a produção de CB foi muito baixa. Com LFU, obtiveram-se 0.08 g/L e com RPB, 0.10 g/L (Figura 15). Estes valores corresponderam a apenas 3.7 e 5% da produção obtida com os compostos de referência no meio HS. Não houve produção de com HSSL e soro do leite.

De uma forma geral, os resíduos ou subprodutos industriais são ricos em fontes de carbono, azoto, fósforo e outros minerais, vitaminas, entre outros. Por este motivo muitos são considerados como boas fontes de nutrientes para o crescimento de microrganismos e, conseqüentemente, produção de compostos de interesse comercial. No entanto alguns destes resíduos podem ser deficientes em determinados nutrientes. Adicionalmente estes resíduos podem conter outros compostos que podem inibir tanto o crescimento microbiano como a produção de CB. Nos ensaios efectuados apenas se considerou a concentração das fontes de carbono principais nos resíduos escolhidos não tendo sido tida em atenção a composição dos restantes nutrientes e a possível existência de compostos inibidores do metabolismo microbiano.

Desta forma, a baixa produção de CB poderia ter resultado da presença de compostos inibidores ou da ausência de nutrientes essenciais ao crescimento dos microrganismos. Na tentativa de aumentar a produção e verificar se a baixa produção resultaria de presença de compostos inibitórios efectuaram-se ensaios com concentrações menores de resíduos.

3.2.2. Testes de diluições dos resíduos

Para determinação da concentração ideal dos resíduos para a produção CB efectuaram-se ensaios em que os resíduos foram diluídos. Testaram-se diferentes conjuntos de diluições para cada um deles, que foram escolhidas de acordo com as concentrações das fontes de carbono principais de cada resíduo e com os resultados da secção anterior e os resultados apresentam-se na Figura 16.

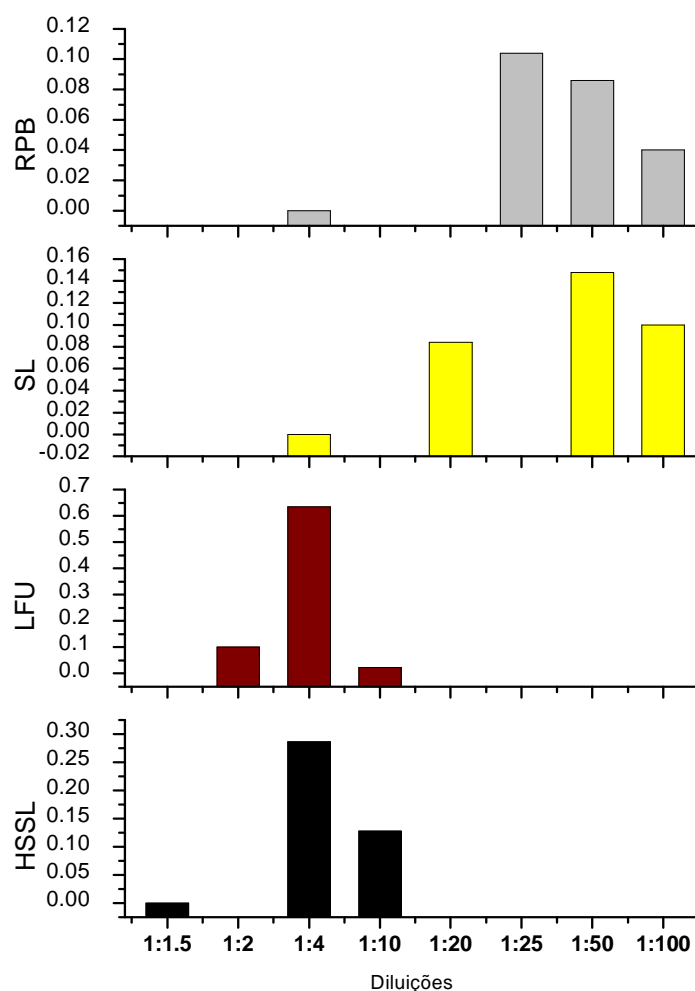


Figura 16. Resultados de todas as diferentes diluições testadas para cada resíduo.

De uma forma geral, a diluição dos resíduos promoveu um considerável aumento na produção de CB em relação aos resultados obtidos nos ensaios efectuados

com 20 g/L (Figura 17). No entanto, a diluição óptima dependeu do tipo de resíduo utilizado. Os factores de diluição óptimos foram 1:4, 1:4, 1:50 e 1:25 para o HSSL, LFU, SL e RPB, respectivamente. Nestas condições, o aumento de produção de CB mais significativo foi obtido com o HSSL, com uma produção de 0.29 g/L, aproximadamente a mesma obtida a partir do respectivo açúcar referência (Figura 17). No entanto, a produção de CB mais elevada foi obtida com o LFU (0.63 g/L). Esta produção de CB correspondeu apenas a cerca de 20 % daquela obtida através dos açúcares referência (glu+gal) (Figura 17). Finalmente, as produções de CB obtidas com SL e RPB foram similares, cerca de 0.15 e 0.10 g/L, respectivamente, o que corresponde a cerca de 50 % e 5% da produção obtida a partir da lactose e glicerol puros (Figura 17).

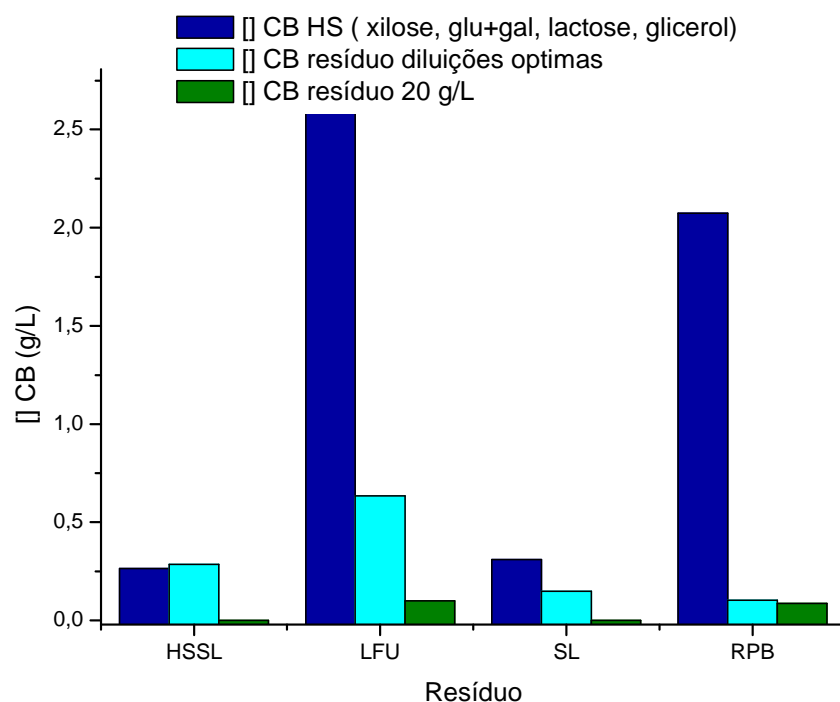


Figura 17. Comparação entre os valores de CB produzida pelos diferentes resíduos com factores de diluição óptimos, com os resíduos com 20 g/L de fonte de carbono e com as respectivas fontes de carbono maioritárias em meio HS.

Com excepção do RPB, foram obtidos melhores resultados de produção utilizando-se maiores diluições. Isto poderá indicar que os fracos resultados obtidos na produção a partir dos resíduos poderão estar associados à presença de substâncias

inibidoras. No entanto, as quantidades de CB obtidas ainda estão longe dos valores obtidos com os compostos de referência com meio HS e aqui poderá indicar que a falta de alguns nutrientes no resíduo também terá influência no resultado. De qualquer forma, as diluições consideradas ótimas nesta etapa foram utilizadas para os restantes ensaios deste trabalho.

3.2.3. Produção de CB a partir dos resíduos com concentração otimizada

Tal como para os meios sintéticos, e uma vez encontrada a melhor diluição, seguiu-se detalhadamente a produção de CB para os resíduos. Os resultados encontram-se representados na Figura 18. Na Figura 19 apresenta-se a variação de pH para os quatro ensaios.

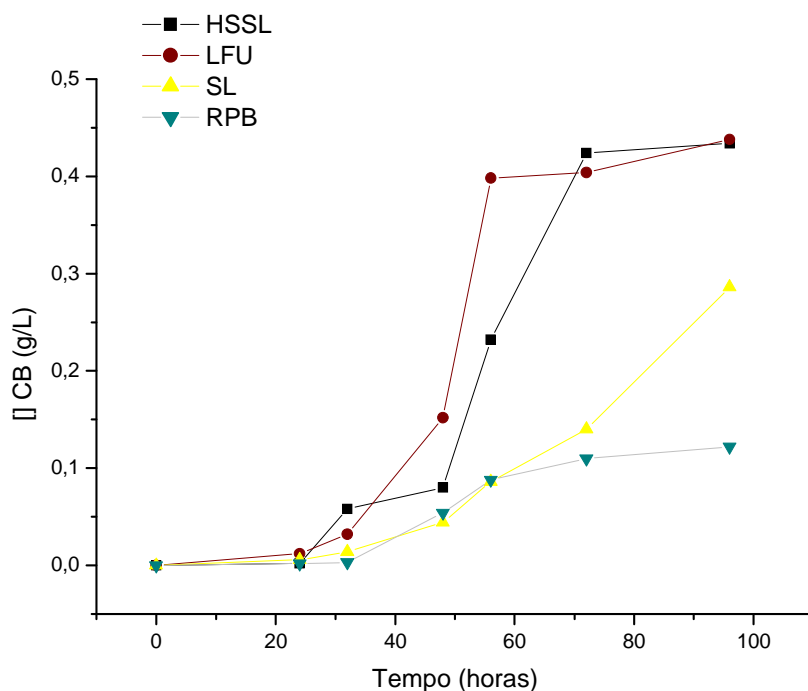


Figura 18. Produção de CB a partir dos diferentes resíduos.

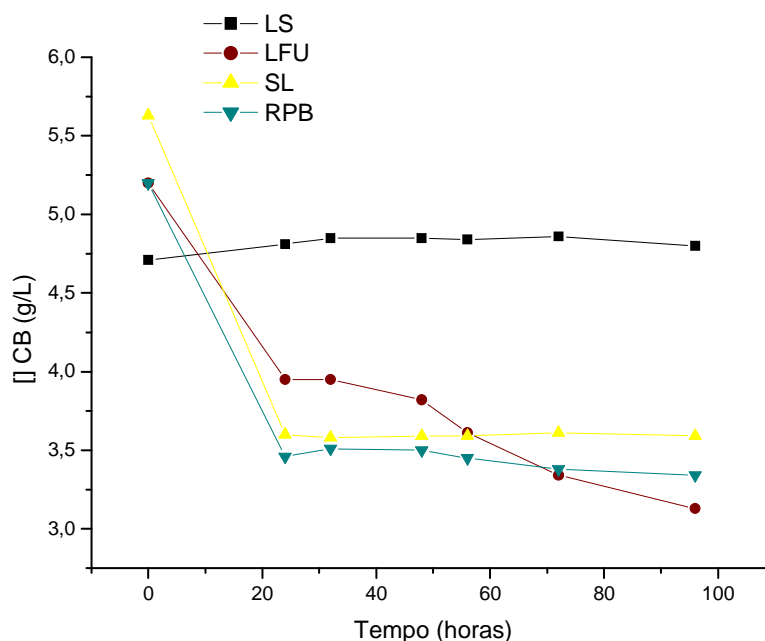


Figura 19. Variação do pH dos resíduos ao longo de 96 horas de produção de CB.

O ensaio com HSSL foi o único em que o pH se manteve constante ao longo do tempo. Para os restantes resíduos verificou-se um decréscimo muito acentuado nas primeiras 24 horas e uma desaceleração a partir das 24 horas e quando o pH é inferior a 4.0. Este abaixamento do pH dos resíduos pode levar a uma limitação, na produção de CB. Sabendo que em cultura estática é difícil o controlar o pH durante o processo, o papel desempenhado pelo pH terá de ser visto com atenção em trabalhos futuros.

No ensaio com HSSL a quantidade de CB produzida após 96 horas foi de 0.43 g/L. Nas primeiras 24 horas a produção de CB foi muito reduzida. A partir das 24 horas aumentou a taxa de produção e os valores mais elevados verificaram-se nos intervalos 48 a 56 e 56 a 72 horas, 0.019 e 0.012 g/L.h respectivamente, e a taxa de produção média é 0.0045 g/L.h. Nas últimas 24 horas verificou-se uma quebra na produção de CB. As membranas de CB produzidas a partir deste resíduo apresentavam uma cor escura, requerendo muito mais lavagens que as obtidas com meios mais claros. Este facto pode constituir uma desvantagem, uma vez que o aumento do tempo de lavagem pode acarretar perdas de massa, diminuindo a concentração real do produto obtido.

No caso do LFU a quantidade de CB produzida foi 0.44 g/L. Nas primeiras 32 horas a produção foi muito baixa. Os intervalos de tempo em que a velocidade de

produção foi maior foram entre 32 e 48 horas, 0.0075 g/L.h, e principalmente entre 48 e 56, 0.031 g/L.h. A partir das 56 horas a produção diminui.

Para o SL obteve-se uma concentração de CB de 0.26 g/L. A produção foi crescente ao longo das 96 horas, verificando-se uma taxa de produção mais elevada entre as 72 e as 96 horas, 0.005 g/L.h.

O RPB foi o substrato com o qual foi obtido um resultado mais baixo, 0.12 g/L após 96 horas. Nas primeiras 32 horas a produção de CB foi quase nula, ocorrendo um aumento da velocidade de produção entre as 32 e as 56 horas, que voltou a diminuir até às 96 horas.

3.3. Comparação dos rendimentos e produtividades utilizando resíduos e os respectivos meios de referência complexos

Na Tabela 3 comparam-se os valores da concentração inicial de substrato (S_i), das quantidades de CB produzida (ΔCB) e de substrato consumido (ΔS), grau de conversão de substrato (α), rendimento CB/substrato ($Y_{CB/S}$) e taxa de produção de CB (r_{CB}) obtidos nas experiências efectuadas com meio definido sintético e com resíduos.

Tabela 3. Diferentes parâmetros relativos à produção de CB.

Fonte de carbono	S_i (g/L)	ΔCB (g/L)	ΔS (g/L)	α (%)	$Y_{CB/S}$ (g/g)	r_{CB} (g/L.h)
Glucose	18.6	2.70	12.0	64.5	0.23	0.028
Xilose	18.4	0.26	1.94	10.4	0.14	0.0028
Glu+Gal	20.3	2.60	12.5	61.5	0.21	0.027
Lactose	23.9	0.31	3.20	14.3	0.09	0.0032
Glicerol	21.9	2.07	6.44	29.0	0.32	0.021
HSSL	8.30	0.43	2.36	28.3	0.18	0.0045
LFU	11.5	0.44	1.83	15.9	0.24	0.0046
SL	5.90	0.26	2.49	41.6	0.10	0.0027
RPB	46.9	0.12	1.70	3.60	0.07	0.0013

Nas experiências com os meios sintéticos contendo as fontes de carbono de referência verificou-se que nos meios de xilose e lactose, o consumo de substrato foi muito reduzido, tal como a quantidade de CB produzida. Estes baixos consumos

reflectiram-se nas baixas taxas de conversão, que, para os dois meios considerados rondam os 10 % e nos valores de rendimento, cerca de 0.1 g/g para ambos. A partir destes valores confirma-se a dificuldade da bactéria em converter estas fontes de carbono em CB, muito possivelmente por não possuir vias metabólicas que lhe permitam utilizar os dois açúcares. Na experiência com glucose foram consumidos 64.5 % do substrato disponível inicialmente e obteve-se um rendimento de 0.23 g/g. Na experiência glu+gal verificou-se também um consumo elevado da fonte de carbono, 61.5 % tal como elevada produção de CB que resultaram num rendimento de 0.21 g/g. No teste com glicerol, 29 % de substrato foram consumidos e produziram-se 2.10 g/L de CB correspondendo a um rendimento de 0.32 g/g. As taxas de produção dos meios com glucose, glu+gal e glicerol foram semelhantes, enquanto nos meios de xilose e lactose foram são inferiores cerca de uma ordem de grandeza.

Nas experiências com resíduos, as concentrações iniciais de fonte de carbono foram de 8.30 g/L para o HSSL, 11.5 g/L para o LFU, 5.90 g/L para o SL e 46.9 g/L para o RPB. Os valores de taxa de conversão para o HSSL e para o SL foram mais elevados que os dos respectivos meios sintéticos, 28.3 e 41.6% respectivamente, mas estes valores não se reflectiram significativamente num aumento da quantidade de CB produzida, indicando que o microrganismo utilizou o substrato extra para outros processos microbianos. O LFU resultou na taxa de conversão mais baixa que o respectivo meio referência tal como na experiência com RPB de apenas 3.6%. Na experiência com este resíduo obteve-se o rendimento mais baixo, 0.07 g/g. Os rendimentos obtidos nas experiências com os restantes resíduos foram próximos dos obtidos nas experiências com meios sintéticos.

As taxas de produção obtidas nas experiências com HSSL e SL foram da mesma ordem de grandeza que as dos meios referência correspondentes, enquanto para os restantes resíduos foram uma ordem de grandeza abaixo.

Para além da fonte de carbono maioritária, alguns resíduos continham também glucose. A glucose faz parte constituição de dois dos resíduos utilizados, o HSSL (em pequena quantidade) [5] e o LFU [54], mas como a suspensão de bactéria utilizada como inóculo foi preparada a partir de meio HS com glucose, esta foi detectada no teste com SL mas em pequena quantidade. No teste com RPB não se detectou devido a não ter sido possível quantificar a concentração de glucose disponível. No entanto, como o inóculo foi efectuado da mesma forma que para os restantes resíduos, será de esperar que na experiência com este resíduo a glucose estivesse disponível em pequena

quantidade. Por esta razão é importante distinguir quais das fontes de carbono disponíveis foram consumidas pela bactéria e consequentemente quais teriam sido efectivamente utilizadas para a produção de CB. As fontes de carbono consumidas nos testes efectuados apresentam-se na Tabela 4.

Tabela 4. Fontes de carbono consumidas em cada resíduo.

Resíduo	S _i Total (g/L)	ΔS (g/L)					S ₀ Total (g/L)
		Glucose	Lactose	Xilose	Glicerol	Galactose	
HSSL	8.30	1.60	-	0.76	-	-	5.97
LFU	11.5	2.15	-	-	-	0	9.70
SL	5.90	2.61	0	-	-	-	3.49
RPB	46.9	-	-	-	1.70	-	45.2

A partir dos resultados da tabela foi possível verificar que a glucose foi consumida preferencialmente em relação às restantes fontes de carbono. No caso do SL e do LFU a glucose foi mesmo a única fonte de carbono consumida. Na experiência com HSSL, a xilose também foi consumida embora em menor quantidade. No teste com RPB, seria de esperar que a glucose também fosse consumida preferencialmente, embora o glicerol também tenha sido consumido. Em trabalhos futuros o inóculo deverá ser lavado de forma a eliminar a fonte de carbono utilizada no seu crescimento.

Quando se comparam as quantidades de substrato consumidas nas experiências com resíduos com as efectuadas com as fontes de carbono principais em meio HS, verificou-se que a quantidade de substrato consumida nas primeiras foi inferior às das segundas. Por exemplo no teste com HSSL, verificou-se que apesar da glucose ser consumida preferencialmente, nem esta nem a xilose foram consumidas na totalidade. Além disso verificou-se um decréscimo na taxa de produção de CB após 72 horas de cultivo (Figura 18) que pode estar relacionado com a falta de nutrientes no meio. No caso do teste com LFU, a quebra de produção ocorreu às 56 horas. Este resíduo contém uma quantidade elevada de glucose que não foi consumida na sua totalidade ao fim de 96 horas de cultivo. Nestes dois casos, a diminuição da taxa de produção, não terá resultado da falta de fonte de carbono, mas deverá estar associada à falta de nutrientes. Para a experiência com SL verificou-se uma produção de CB crescente ao longo das 96 horas, porém sempre muito lenta, não a partir da lactose, que não é facilmente

metabolizada pela maioria dos microrganismos, mas da glucose proveniente do inoculo que foi consumida quase totalmente. No caso do RPB, a quantidade de CB produzida foi muito baixa, inferior aos 2.10 g/L obtidas com meio HS com glicerol, mesmo com a possibilidade do meio conter glucose. Este resultado poderá estar também relacionado com a exaustão de algum nutriente essencial ou ter resultado da presença de compostos presentes no RPB que inibem a produção de CB, como o metanol [53].

3.4. Efeito da adição de nutrientes aos resíduos

De forma a compreender a influência da presença de nutrientes essenciais ao crescimento de microrganismo e consequentemente à produção de CB efectuaram-se testes com os quatro resíduos escolhidos a que foram adicionados compostos que actuem como fonte de azoto ou de fosfato. O meio HS contém peptona e E.L que funcionam como fonte de fosfato e fonte orgânica de azoto. O E.L., além do azoto é também fonte de vitaminas e sais minerais. Testou-se a influência de fontes de nutrientes, azoto e fosfato sobre a produção, através da adição directa destes compostos contendo estes elementos aos meios de cultura constituídos pelos resíduos diluídos.

Assim, a influência da fonte orgânica ou inorgânica de azoto, foi testada através da adição de sulfato de amónia ou E.L.. A influência da fonte de fosfato foi testada através da adição de fosfato de potássio. Testou-se também E.L. combinado com KH_2PO_4 ; e KH_2PO_4 combinado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. As quantidades de CB obtidas nestes testes foram comparadas com os valores obtidos com resíduo sem adição de sais após 96 horas. Os resultados obtidos para o HSSL, LFU, SL e RPB apresentam-se na Figura 20, Figura 21, Figura 22 e Figura 23, respectivamente.

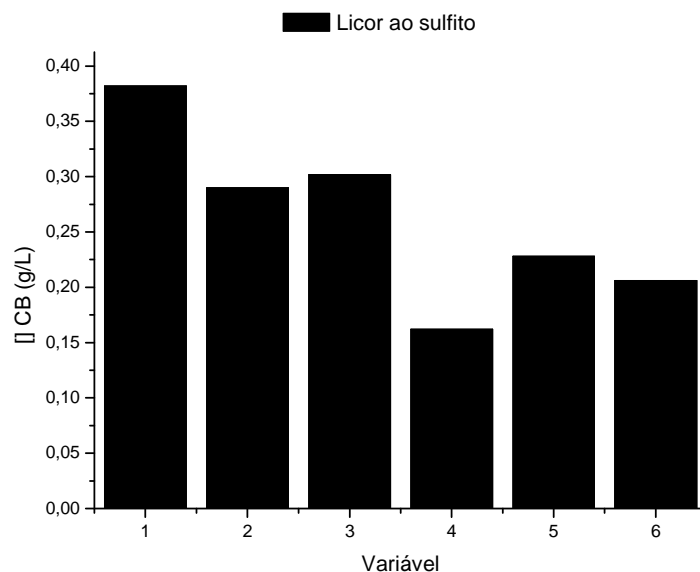


Figura 20. Produção de CB obtida nos meios contendo HSSL com diluição 1:4 e contendo os seguintes sais: 1- E.L. + KH_2PO_4 ; 2- E.L.; 3- KH_2PO_4 ; 4- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 5- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + KH_2PO_4 ; 6- Sem sais adicionados.

Nos ensaios relativos ao HSSL a concentração obtida na experiência sem adição de sais foi de 0,21 g/L. De todos os ensaios apenas aquele em que foi adicionado $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ combinado com KH_2PO_4 deu origem a uma concentração inferior a este valor, 0,16 g/L. Nos restantes ensaios foram obtidas concentrações de CB superiores, sendo o melhor resultado obtido com o meio a que foi adicionado E.L. combinado com KH_2PO_4 , 0,38 g/L, correspondendo a um aumento de cerca de 85 % em relação ao valor obtido inicialmente. Este resultado pode confirmar a falta de nutrientes e de fosfato no HSSL.

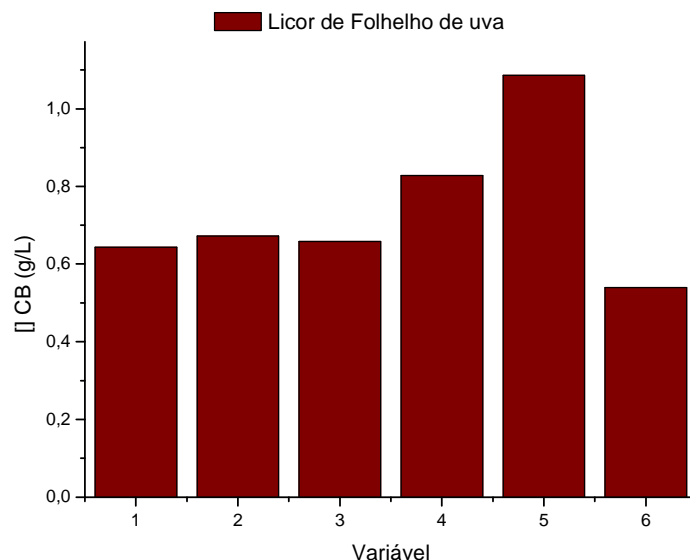


Figura 21. Produção de CB obtida nos meios contendo LFU com diluição 1:4 e contendo os seguintes sais: 1- E.L. + KH_2PO_4 ; 2- E.L.; 3- KH_2PO_4 ; 4- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 5- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + KH_2PO_4 ; 6- Sem sais adicionados.

No caso do LFU, a quantidade de CB obtida no meio sem sais adicionados foi 0.54 g/L. Verificou-se que a produção de CB melhorou em todas as experiências com adição de sais. Os melhores resultados foram 0.83 g/L (53 %), obtido com a adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e 1.09 g/L (100 %), obtido com a adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ combinado com KH_2PO_4 . Estes resultados podem indicar a falta de azoto e de fósforo no meio.

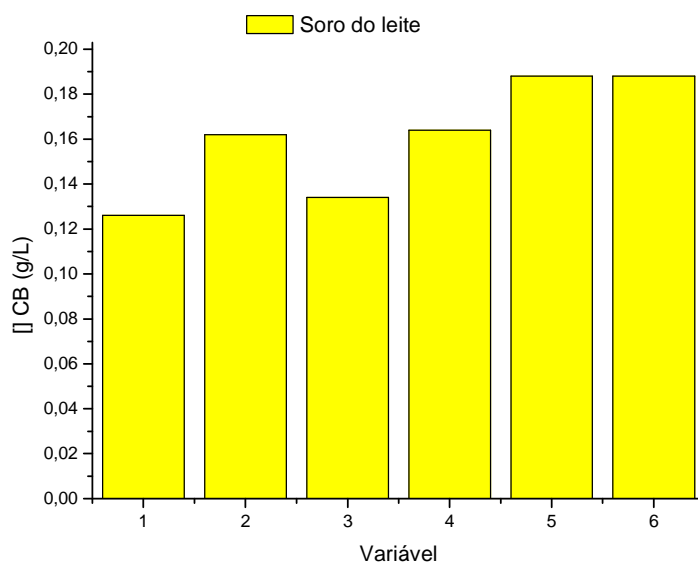


Figura 22. Produção de CB obtida nos meios contendo SL com diluição 1:4 e contendo os seguintes sais: 1- E.L. + KH_2PO_4 ; 2- E.L.; 3- KH_2PO_4 ; 4- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 5- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + KH_2PO_4 ; 6- Sem sais adicionados.

No caso dos ensaios efectuados com SL, os resultados obtidos foram praticamente iguais ou ligeiramente inferiores ao valor obtido sem adição de sais, 0.19 g/L, ou seja, não foi possível melhorar a produção de CB a partir de nenhum destes ensaios. Sendo este resíduo rico em proteínas e outros nutrientes como certas vitaminas e sais minerais, a adição de sais não deveria contribuir para a melhoria dos resultados tal como se observou. Desta forma, confirmou-se que a baixa produtividade em CB obtida utilizando o SL com substrato pode estar associada à dificuldade em utilizar a lactose pela cultura seleccionada.



Figura 23. Produção de CB obtida nos meios contendo RPB com diluição 1:4 e contendo os seguintes sais: 1- E.L. + KH_2PO_4 ; 2- E.L.; 3- KH_2PO_4 ; 4- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 5- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + KH_2PO_4 ; 6- Sem sais adicionados.

Considerando os ensaios com o RPB, os meios aos quais foram adicionados E.L. combinado com KH_2PO_4 e E.L, foram os que apresentaram maiores quantidades de CB produzida, 0.42 e 0.47 g/L de CB, respectivamente. Estes resultados representaram uma melhoria significativa ao valor inicialmente obtido sem sais, 0.15 g/L, e demonstraram que uma das limitações da utilização do RPB para a produção de CB era a falta de nutrientes do meio. Já nos meios contendo KH_2PO_4 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, separadamente, a

concentração de CB formada foi nula ou muito baixa. Com estes dois sais combinados a concentração obtida também foi baixa, 0.050 g/L, estes compostos parecem inibir a produção de CB a partir do RPB.

3.5. Caracterização da CB

As membranas de CB obtidas nos meios de cultura contendo os diferentes resíduos industriais ou os compostos referência foram caracterizadas em termos de estrutura química, grau de cristalinidade e morfologia através de FTIR, XRD e SEM, respectivamente.

3.5.1. FTIR

A Figura 24 representa os espectros FTIR das membranas de CB obtidas a partir dos meios referência contendo as fontes de carbono principais em meio HS e a Figura 25 representa os espectros obtidos a partir dos resíduos.

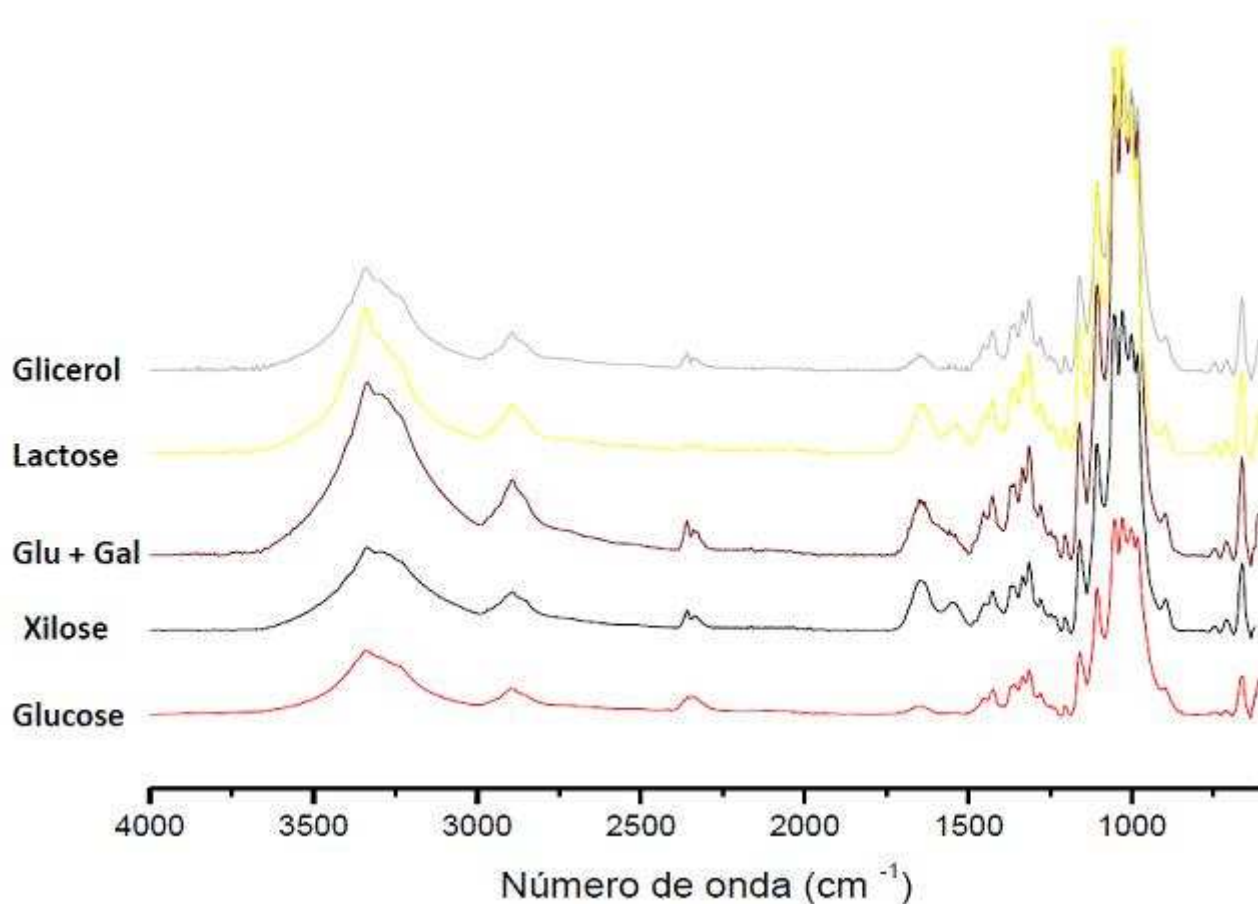


Figura 24. Gráficos FTIR de CB produzida a partir das fontes de carbono principais dos resíduos em meio HS.

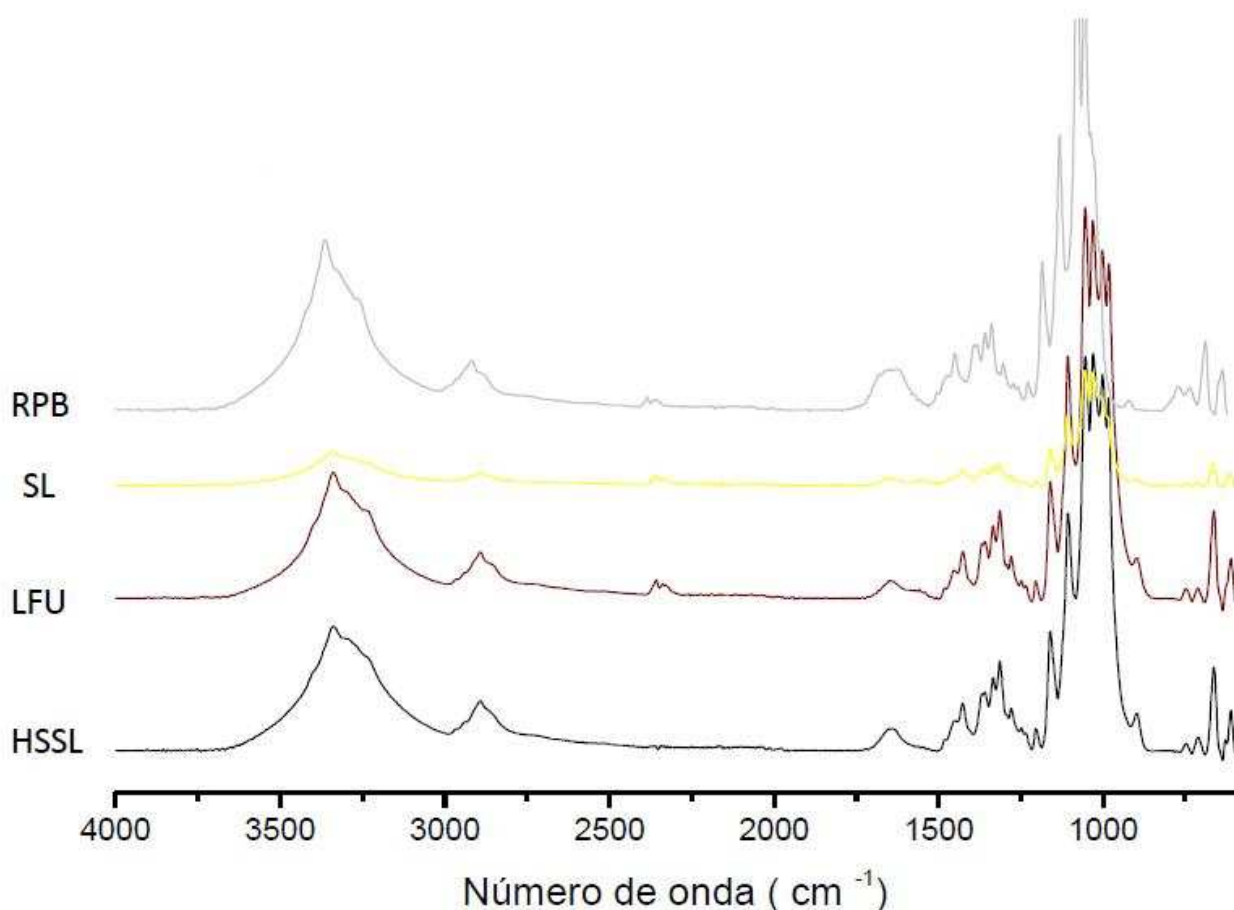


Figura 25. Gráficos FTIR de CB produzida a partir dos resíduos.

Todos os espectros obtidos, tanto os das membranas produzidas em meios compostos por resíduos como os das membranas resultantes dos meios referência, apresentaram os picos vibracionais característicos de um espectro FTIR de celulose. Destes, os principais ocorreram a 3300 cm^{-1} correspondente à vibração dos grupos OH, 2880 cm^{-1} correspondente às vibrações das ligações C-H e 1100 cm^{-1} que corresponde aos grupos C-O-C. Esta técnica também confirmou a efectividade dos processos de lavagem e purificação das membranas, uma vez que nos espectros não apareceram picos vibracionais que não sejam os relativos à CB.

3.5.2. Difraccção de Raio-X

A difracção de raio-X foi usada de forma a comparar possíveis alterações microestruturais da CB produzida a partir dos diferentes meios, e também para estimar possíveis perturbações no processo de cristalização resultantes da utilização de meios reais. Na Figura 26 está representado, como exemplo, o difratograma de raio-X da CB

produzida a partir do licor de folhelho de uva em comparação com a CB produzida a partir do meio HS referência.

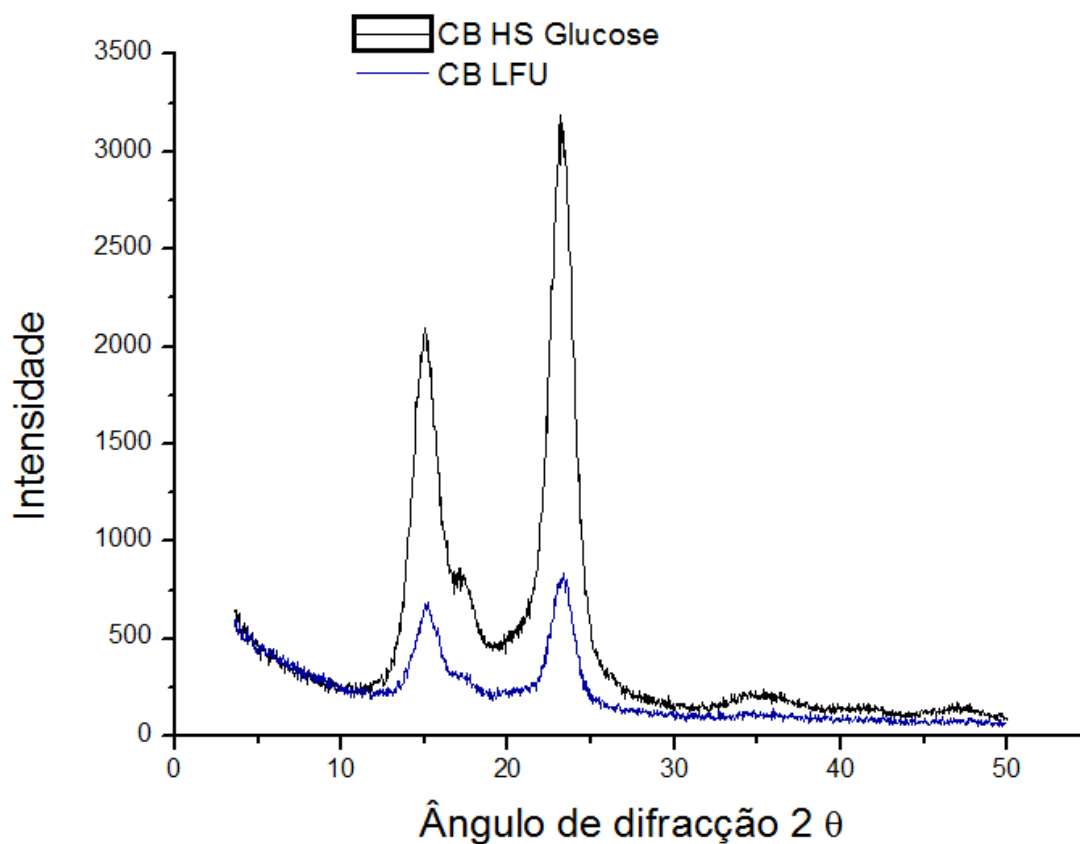


Figura 26. Difratomogramas de raio-X das membranas de CB de meio HS referência e de licor de folhelho de uva.

Todas as membranas analisadas apresentaram um difratograma típico de celulose do tipo I, com os picos de difracção, a 2θ : 14.2°, 16.4° e 22.4°, normalmente atribuídos aos planos de difracção (101), (10 $\bar{1}$) e (002). O índice de cristalinidade relativa da CB produzida com o meio referência e com o licor de folhelho foi de 72.6 e 73.9%, respectivamente. Os restantes resíduos originaram membranas de CB com valores de índice de cristalinidade muito semelhantes ao do licor do folhelho, o que sugere que a composição dos resíduos não afecta significativamente este parâmetro.

3.5.3. SEM

A Figura 27 apresenta uma micrografia electrónica da membrana de CB obtida a partir soro do leite.

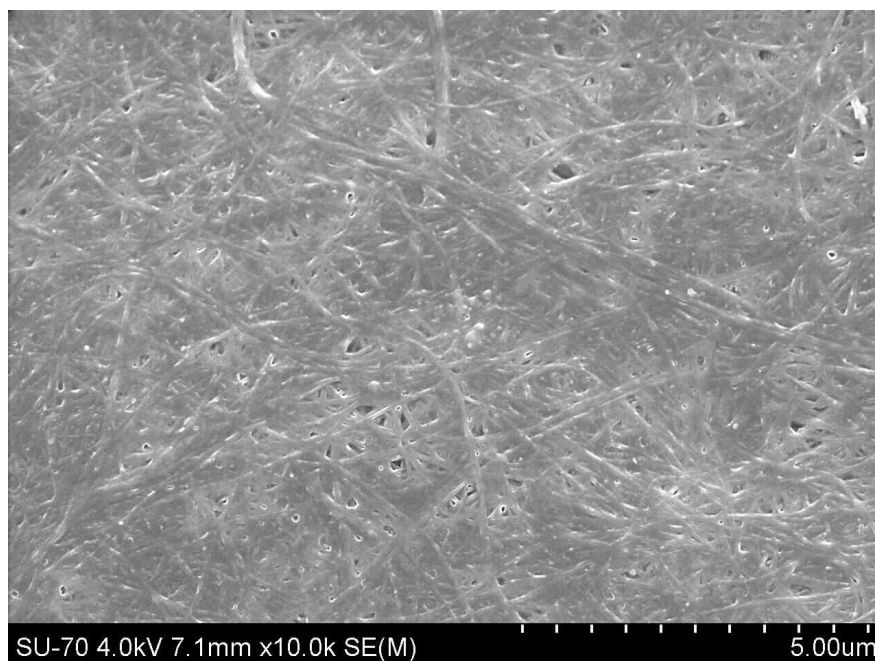


Figura 27. Micrografia electrónica da membrana de CB obtida através do soro do leite.

As diferentes imagens de micrografia electrónica confirmaram a estrutura tridimensional característica da CB, bem como a ausência de contaminantes, não existindo diferenças significativas entre as membranas obtidas com os diferentes meios.

4. Conclusões

A CB é um material com propriedades únicas que permitem a sua aplicação em áreas variadas. No entanto, a CB apresenta uma desvantagem que limita a sua produção em larga escala que é o elevado custo do meio de cultura. Com este trabalho pretendeu-se avaliar quatro resíduos ou subprodutos industriais como fonte de carbono e nutrientes para a produção de CB com o objectivo de baixar os custos de produção.

Na primeira parte do trabalho foi testada a produção de CB a partir das fontes de carbono maioritárias dos resíduos ou subprodutos industriais, em meio HS. Os resultados obtidos foram 2.7 g/L, 2.6 g/L, 2.1 g/L, 0.31 g/L e 0.26 g/L, para a glucose, glu+gal, glicerol, lactose e xilose, respectivamente. De uma forma geral estes resultados estão de acordo com os trabalhos publicados nesta área.

Os resíduos ou subprodutos industriais escolhidos foram o licor ao sulfito, o licor do folhelho de uva, o soro do leite e o resíduo da produção de biodiesel. Os resultados obtidos mostram que todos os resíduos permitiram a produção de CB, embora em quantidades diferentes. O resíduo com o qual foi obtido melhor resultado foi o LFU, com uma produção máxima, sem adição de qualquer outro nutriente, de 0.63 g/L. Seguiu-se o HSSL com uma produção de CB de 0.43 g/L. Com o SL foi obtida uma produção de CB de 0.26 g/L. O resíduo com o qual foi obtido um resultado mais baixo foi o RPB, 0.15 g/L.

Os baixos resultados de produção de CB com a concentração de fonte de carbono nos resíduos aproximada a 20 g/L colocaram a hipótese de que uma das limitações destes seria a presença de substâncias inibitórias, uma vez que, com a excepção do RPB, em todos os resíduos foram obtidos melhores resultados utilizando concentrações bastante mais baixas.

As baixas quantidades de CB obtida podem também ter resultado da falta de nutrientes essenciais para os microrganismos nos resíduos. De forma a compensar esta limitação, diferentes nutrientes, sobretudo fontes de azoto e fósforo, foram adicionados a todos os resíduos. No meio com HSSL suplementado com E.L. conjugado com KH_2PO_4 , verificou-se um aumento de produção de CB de 85 % em relação ao valor obtido sem adição de nutrientes, o que confirmou esta segunda hipótese. Uma outra limitação deste resíduo foi o facto de a xilose não ser facilmente metabolizável por esta bactéria. No LFU a produção de CB aumentou 100 % em relação ao teste inicial sem sais, com a adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4 , o que mostrou a falta de azoto e de fosfato

neste resíduo. Foi nos ensaios com RPB que se verificou o maior aumento de produção de CB em relação ao valor inicial, cerca de 206 %, quando adicionado E.L. ao resíduo. Nos testes com SL a produção de CB não melhorou com nenhum dos compostos adicionados. Este resultado seria de esperar, uma vez que este resíduo é rico em proteínas e outros nutrientes, assim, a baixa produtividade em CB deveu-se provavelmente à dificuldade da bactéria em utilizar a lactose como fonte de carbono.

De uma forma geral, os resíduos testados são pobres em nutrientes, com excepção do SL, onde a produção de CB é limitada pela fonte de carbono principal. Com o HSSL e o RPB foi possível aumentar consideravelmente a produção de CB com a adição de E.L., que, no entanto, é um composto caro. Assim, dos resíduos testados, o mais promissor é o LFU, que além de ser o resíduo com o qual é obtido melhor resultado sem adição de qualquer composto, foi possível aumentar a produção para o dobro, cerca de 1 g/L, com a adição de compostos consideravelmente mais baratos que o E.L.. Este valor (1 g/L) corresponde a cerca de 37% da produção obtida no meio referência com glucose, extracto de levedura e peptona (2.7 g/L). Em trabalhos futuros deve ser procurado um resíduo da indústria portuguesa que possa substituir o E.L., que funcione como a água de maceração de milho, que para além de fonte de fosfato e azoto é mais rico em nutrientes que o próprio E.L.

As membranas de CB produzidas foram caracterizadas pelas seguintes técnicas: espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR); difracção de raio-X (XRD) e por microscopia electrónica de varrimento (SEM). Foram obtidos espectros típicos de celulose, bem como confirmada a estrutura tridimensional da CB.

5. Referências bibliográficas

- [1]. Huber, G.W., S. Iborra, and A. Corma, *Synthesis of transportation fuels from biomass: Chemistry, catalysts, and engineering*. Chemical Reviews, 2006. **106**(9): p. 4044-4098.
- [2]. El-Saied, H., A.I. El-Diwany, A.H. Basta, N.A. Atwa, and D.E. El-Ghwas, *Production and characterization of economical bacterial cellulose*. Bioresources, 2008. **3**(4): p. 1196-1217.
- [3]. Keshk, S. and K. Sameshima, *Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production*. African Journal of Biotechnology, 2005. **4**(6): p. 478-482.
- [4]. Keshk, S., T.M.A. Razek, and K. Sameshima, *Bacterial cellulose production from beet molasses*. African Journal of Biotechnology, 2006. **5**(17): p. 1519-1523.
- [5]. Xavier, A., M.F. Correia, S.R. Pereira, and D.V. Evtuguin, *Second-generation bioethanol from eucalypt sulphite spent liquor*. Bioresource Technology, 2010. **101**(8): p. 2755-2761.
- [6]. Siso, M.I.G., *The biotechnological utilization of cheese whey: A review*. Bioresource Technology, 1996. **57**(1): p. 1-11.
- [7]. Knothe, G., *Introduction*, in *The Biodiesel Handbook*. 2005, AOCS Press: Champaign, Illinois.
- [8]. Klemm, D., B. Heublein, H.P. Fink, and A. Bohn, *Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material*. Angewandte Chemie-International Edition, 2005. **44**(22): p. 3358-3393.
- [9]. Pecoraro, E., D. Manzani, Y. Messaddeq, and S.J.L. Ribeiro, *Bacterial Cellulose from Gluconacetobacter xylinus: Preparation , Properties and Applications*, in *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. 2008, ELSEVIER: Amsterdam.
- [10]. Mohan, D., C.U. Pittman, and P.H. Steele, *Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: A critical review*. Energy & Fuels, 2006. **20**(3): p. 848-889.
- [11]. Ross, P., R. Mayer, and M. Benziman, *Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria*. Microbiological Reviews, 1991. **55**(1): p. 35-58.
- [12]. Krässig, H.A., *Cellulose - Structure, Accessibility and Reactivity*. 1993, Amsterdam: Gordon and Breach Science Publishers.

- [13]. Brown, R.M., *Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century?* Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry, 2004. **42**(3): p. 487-495.
- [14]. Brown, A.J., *XLIII.-On an acetic ferment which forms cellulose.* Journal of the Chemical Society, Transactions, 1886. **49**: p. 432-439.
- [15]. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2 ed. The Proteobacteria, ed. G.M. Garrity. Vol. 2. 2005, East Lansing, MI: Springer.
- [16]. Chawla, P.R., I.B. Bajaj, S.A. Survase, and R.S. Singhal, *Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications.* Food Technology and Biotechnology, 2009. **47**(2): p. 107-124.
- [17]. Grometelhanan, Z. and S. Hestrin, *Synthesis of cellulose by Acetobacter Xylinum VI. Growth on Citric Acid-Cycle Intermediates.* Journal of Bacteriology, 1963. **85**(2).
- [18]. Park, J.K., J.Y. Jung, and Y.H. Park, *Cellulose production by Gluconacetobacter hansenii in a medium containing ethanol.* Biotechnology Letters, 2003. **25**(24): p. 2055-2059.
- [19]. Yoshino, T., T. Asakura, and K. Toda, *Cellulose production by Acetobacter pasteurianus on silicone membrane.* Journal of Fermentation and Bioengineering, 1996. **81**(1): p. 32-36.
- [20]. Hong, F. and K.Y. Qiu, *An alternative carbon source from konjac powder for enhancing production of bacterial cellulose in static cultures by a model strain Acetobacter aceti subsp xylinus ATCC 23770.* Carbohydrate Polymers, 2008. **72**(3): p. 545-549.
- [21]. Helenius, G., H. Backdahl, A. Bodin, U. Nannmark, P. Gatenholm, and B. Risberg, *In vivo biocompatibility of bacterial cellulose.* Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2006. **76A**(2): p. 431-438.
- [22]. Zaar, K., *Biogenesis of Cellulose by Acetobacter Xylinum.* Cytobiologie, 1977. **16**(1): p. 1-15.
- [23]. Yamanaka, S., K. Watanabe, M. Iguchi, and Y. Nishi, *Production, property, and application of bacterial cellulose.* Nippon Nogeikagaku Kaishi-Journal of the Japan Society for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry, 1998. **72**(9): p. 1039-1044.
- [24]. Bielecki, S., *Bacterial Cellulose*, in *Biopolymers*. 2002, Wiley-VCH. p. 37-90.

- [25]. Jonas, R. and L.F. Farah, *Production and application of microbial cellulose*. Polymer Degradation and Stability, 1998. **59**(1-3): p. 101-106.
- [26]. Linder, M. and T.T. Teeri, *The roles and function of cellulose-binding domains*. Journal of Biotechnology, 1997. **57**(1-3): p. 15-28.
- [27]. Gelin, K., A. Bodin, P. Gatenholm, A. Mihranyan, K. Edwards, and M. Stromme, *Characterization of water in bacterial cellulose using dielectric spectroscopy and electron microscopy*. Polymer, 2007. **48**(26): p. 7623-7631.
- [28]. Czaja, W., A. Krystynowicz, S. Bielecki, and R.M. Brown, *Microbial cellulose - the natural power to heal wounds*. Biomaterials, 2006. **27**(2): p. 145-151.
- [29]. Legge, R.L., *Microbial cellulose as a speciality chemical* Biotechnology Advances, 1990. **8**(2): p. 303-319.
- [30]. Shah, J. and R.M. Brown, *Towards electronic paper displays made from microbial cellulose*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005. **66**(4): p. 352-355.
- [31]. Budhiono, A., B. Rosidi, H. Taher, and M. Iguchi, *Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system*. Carbohydrate Polymers, 1999. **40**(2): p. 137-143.
- [32]. Jagannath, A., A. Kalaiselvan, S.S. Manjunatha, P.S. Raju, and A.S. Bawa, *The effect of pH, sucrose and ammonium sulphate concentrations on the production of bacterial cellulose (Nata-de-coco) by Acetobacter xylinum*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2008. **24**(11): p. 2593-2599.
- [33]. http://www.goudasfoods.com/recipe/recipe_prev.php?recipe_id=123, 27-11-10.
- [34]. Brown, E.E., Bacterial Cellulose/Thermoplastic Polymer Nanocomposites, Masters Thesis, in Department of Chemical Engineering, Washington 2007.
- [35]. Wan, W. and L. Millon, *Hydrogel/cellulose composite material useful in designing and fabrication of medical devices e.g. stents, comprises preset amount of hydrogel, cellulose-fibers having nanometer scale cross-sectional dimensions and solvent*. 2009, WAN W (WANW-Individual) MILLON L (MILL-Individual). p. 1660147-A1:.
- [36]. Charpentier, P.A., A. Maguire, and W.K. Wan, *Surface modification of polyester to produce a bacterial cellulose-based vascular prosthetic device*. Applied Surface Science, 2006. **252**(18): p. 6360-6367.

- [37]. Backdahl, H., G. Helenius, A. Bodin, U. Nannmark, B.R. Johansson, B. Risberg, and P. Gatenholm, *Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells*. Biomaterials, 2006. **27**(9): p. 2141-2149.
- [38]. Surma-Slusarska, B., S. Presler, and D. Danielewicz, *Characteristics of Bacterial Cellulose Obtained from Acetobacter Xylinum Culture for Application in Papermaking*. Fibres & Textiles in Eastern Europe, 2008. **16**(4): p. 108-111.
- [39]. Battad-Bernardo, E., S.L. McCrindle, I. Couperwhite, and B.A. Neilan, *Insertion of an E-coli lacZ gene in Acetobacter xylinus for the production of cellulose in whey*. Fems Microbiology Letters, 2004. **231**(2): p. 253-260.
- [40]. Pourramezan, G.Z., A.M. Roayaei, and Q.R. Qezelbash, *Optimization of Culture Conditions for Bacterial Cellulose Production by Acetobacter sp. 4B-2*. Biotechnology 2009. **1**: p. 150-154.
- [41]. Nguyen, V.T., B. Flanagan, M.J. Gidley, and G.A. Dykes, *Characterization of Cellulose Production by a Gluconacetobacter xylinus Strain from Kombucha*. Current Microbiology, 2008. **57**(5): p. 449-453.
- [42]. Krystynowicz, A., W. Czaja, A. Wiktorowska-Jezierska, M. Goncalves-Miskiewicz, M. Turkiewicz, and S. Bielecki, *Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2002. **29**(4): p. 189-195.
- [43]. Hestrin, S. and M. Schramm, *Synthesis of Cellulose by Acetobacter xylinum 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose*. Biochemical Journal, 1954. **58**(2): p. 345-352.
- [44]. Rivas, B., A.B. Moldes, J.M. Dominguez, and J.C. Parajo, *Development of culture media containing spent yeast cells of Debaryomyces hansenii and corn steep liquor for lactic acid production with Lactobacillus rhamnosus*. International Journal of Food Microbiology, 2004. **97**(1): p. 93-98.
- [45]. Chao, Y., Y. Sugano, and M. Shoda, *Bacterial cellulose production under oxygen-enriched air at different fructose concentrations in a 50-liter, internal-loop airlift reactor*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001. **55**(6): p. 673-679.
- [46]. Son, H.J., H.G. Kim, K.K. Kim, H.S. Kim, Y.G. Kim, and S.J. Lee, *Increased production of bacterial cellulose by Acetobacter sp V6 in synthetic media under shaking culture conditions*. Bioresource Technology, 2003. **86**(3): p. 215-219.

- [47]. Oikawa, T., T. Ohtori, and M. Ameyama, *Production of cellulose from D-manitol by Acetobacter-Xylinum KU-1*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1995. **59**(2): p. 331-332.
- [48]. Jung, H.I., O.M. Lee, J.H. Jeong, Y.D. Jeon, K.H. Park, H.S. Kim, W.G. An, and H.J. Son, *Production and Characterization of Cellulose by Acetobacter sp V6 Using a Cost-Effective Molasses-Corn Steep Liquor Medium*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010. **162**(2): p. 486-497.
- [49]. Boris, A. and Y. Sire, *Impacts of Winemaking Methods on Wastewaters and their Treatment*. S. Afr. J. Enol. Vitic., 2010. **31**: p. 38-44.
- [50]. Kongruang, S., *Bacterial Cellulose Production by Acetobacter xylinum Strains from Agricultural Waste Products*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2008. **148**(1): p. 245-256.
- [51]. Kurosumi, A., C. Sasaki, Y. Yamashita, and Y. Nakamura, *Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by Acetobacter xylinum NBRC 13693*. Carbohydrate Polymers, 2009. **76**(2): p. 333-335.
- [52]. Thompson, D.N. and M.A. Hamilton, *Production of bacterial cellulose from alternate feedstocks*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2001. **91-3**: p. 503-513.
- [53]. Cavalheiro, J., M. de Almeida, C. Grandfils, and M.M.R. da Fonseca, *Poly(3-hydroxybutyrate) production by Cupriavidus necator using waste glycerol*. Process Biochemistry, 2009. **44**(5): p. 509-515.
- [54]. Mendes, J.A.S., Estudo sobre a composição química e possíveis aplicações do folhelho de uva, Tese de mestrado, in Departamento de Química, Aveiro, 2008.
- [55]. Dlamini, A.M. and P.S. Peiris, *Biopolymer production by a Klebsiella oxytoca isolate using whey as fermentation substrate*. Biotechnology Letters, 1997. **19**(2): p. 127-130.
- [56]. Dlamini, A.M. and P.S. Peiris, *Production of exopolysaccharide by Pseudomonas sp ATCG 31461 (Pseudomonas elodea) using whey as fermentation substrate*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1997. **47**(1): p. 52-57.

- [57]. Drahovska, H. and J. Turna, *Construction of Lactose-Utilizing Xanthomonas campestris with a Mini-Mu Derivative*. Applied and Environmental Microbiology, 1995. **61**(2): p. 811-812.
- [58]. Rubio-Teixeira, M., J.I. Castrillo, A.C. Adam, U.O. Ugalde, and J. Polaina, *Highly efficient assimilation of lactose by a metabolically engineered strain of Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 1998. **14**(9): p. 827-837.
- [59]. Huang, G.H., F. Chen, D. Wei, X.W. Zhang, and G. Chen, *Biodiesel production by microalgal biotechnology*. Applied Energy, 2009. **87**(1): p. 38-46.
- [60]. Freitas, F., V.D. Alves, J. Pais, M. Carvalheira, N. Costa, R. Oliveira, and M.A.M. Reis, *Production of a new exopolysaccharide (EPS) by Pseudomonas oleovorans NRRL B-14682 grown on glycerol*. Process Biochemistry, 2010. **45**(3): p. 297-305.
- [61]. Creely, J.J., L. Segal, and L. Loeb, *An x-ray study of new cellulose complexes with diamines containing 3, 5, 6, 7, and 8 carbon atoms*. Journal of Polymer Science, 1959. **36**(130): p. 205-214.
- [62]. Ishihara, M., M. Matsunaga, N. Hayashi, and V. Tisler, *Utilization of D-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose*. Enzyme and Microbial Technology, 2002. **31**(7): p. 986-991.